

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós Graduação em Ciência Florestal**

**Rafaela Naiara de Oliveira**

**PROPAGAÇÃO IN VITRO E CONTROLE DE HIPERIDRICIDADE EM  
CANDEIA (*Eremanthus incanus* (Less.) Less)**

**Diamantina  
2016**

**Rafaela Naiara de Oliveira**

**PROPAGAÇÃO IN VITRO E CONTROLE DE HIPERIDRICIDADE EM  
CANDEIA (*Eremanthus incanus* (Less.) Less)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, nível de mestrado, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Miranda Titon**

**Diamantina  
2016**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

O48p	<p>Oliveira, Rafaela Naiara de Propagação in vitro e controle de hiperidricidade em candeia (<i>Eremanthus incanus</i> (Less.) Less) / Rafaela Naiara de Oliveira. – Diamantina, 2016. 52 p. : il.</p> <p>Orientador: Miranda Titon</p> <p>Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p>1. Cultura de tecidos. 2. Espécie nativa. 3. Recipientes. 4. Vedações. I. Título II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p style="text-align: right;"><b>CDD 631.53</b></p>
------	--

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**PROPAGAÇÃO IN VITRO E CONTROLE DE HIPERIDRICIDADE EM  
CANDEIA (*Eremanthus incanus* (Less.) Less)**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciência Florestal, a nível  
de mestrado, como parte dos requisitos para  
a obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 15 / 03 / 2016

---

Dr.<sup>a</sup> Andréa Dias Koehler  
UFV

---

Prof. Dr. José Barbosa dos Santos  
UFVJM

---

Prof. Dr. Evandro Luiz Mendonça Machado  
UFVJM

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Miranda Titon  
UFVJM  
Presidente

**Diamantina**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me guiar, abençoar, ser fonte de renovação e transformação em minha vida.

À minha mãe, Valdiméia, por todo amor e dedicação. Por estar ao meu lado nos momentos difíceis, aconselhando-me e me encorajando.

Ao meu pai, Fábio, pelo amor, incentivo e exemplo de perseverança.

Ao meu irmão, Fabiano, pelo companheirismo, paciência, por estar ao meu lado mesmo quando eu não mereço.

Às minhas amigas, Laís e Carol, pela amizade, cumplicidade, pelos momentos de alegrias e tristezas compartilhados, por estarem comigo desde a graduação tornando os meus dias mais felizes.

À Professora, Miranda, pela orientação, paciência, dedicação e conhecimento repassado durante todo esse tempo de convivência.

À Natane, por todo auxílio, apoio e dúvidas cessadas.

Aos colegas do Laboratório de Melhoramento Florestal, pela ajuda com os experimentos, pela boa companhia e pelo conhecimento adquirido durante as nossas conversas.

Aos membros da banca pela disponibilidade e contribuições dadas.

À UFVJM, pela oportunidade e formação profissional.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos, que de alguma forma contribuíram e torceram pelo meu sucesso durante esse período.

## RESUMO

OLIVEIRA, Rafaela Naiara. **Propagação in vitro e controle de hiperidricidade em candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less)**, 2016.52p. (Dissertação - Mestrado em Ciência Florestal). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver procedimentos de propagação *in vitro* de *Eremanthus incanus* e controlar a hiperidricidade em explantes durante o cultivo. Foram realizados cinco experimentos, que envolveram as etapas de germinação, multiplicação e alongamento. No experimento um, avaliou-se a influência dos meios de cultura MS e WPM (25, 50, 75 e 100% dos sais e vitaminas) no percentual de germinação e na altura, número de folhas e peso de matéria seca das plântulas produzidas. Nos experimentos dois, três e quatro os tratamentos consistiram de dois tipos de recipientes (tubos de ensaio e frascos de cultura) e quatro formas de vedação (película de PVC, papel celofane, fita microporosa e tampas específicas). No experimento dois, avaliou-se a influência dos recipientes e das formas de vedações sobre o percentual de germinação e de contaminação, altura, número de folhas e peso de matéria seca de plântulas. No experimento três, foram avaliados o número de brotações e a hiperidricidade em explantes na fase de multiplicação, em três subcultivos. Já no experimento quatro, a fase de alongamento foi avaliada em função dos recipientes e formas de vedação, em relação às variáveis altura, hiperidricidade e peso de matéria seca. No experimento cinco, foram testadas quatro concentrações de BAP e de TDZ e avaliados o número de brotações, hiperidricidade e calosidade, em dois subcultivos. No experimento um, o meio WPM75 apresentou o maior percentual de germinação, enquanto o meio MS75 apresentou maior altura e número de folhas, e o WPM100 maior peso de matéria seca. No experimento quatro, as combinações tubo+fita, tubo+PVC e frasco+PVC proporcionaram os maiores percentuais de germinação, enquanto os menores percentuais de contaminação foram observados nos tratamentos tubo+fita e tubo+tampa. A combinação tubo+celofane apresentou maior valor de altura e peso de matéria seca, e frasco+PVC maior número de folhas. Observou-se no experimento três, com relação ao número de brotações, que no subcultivo um a combinação frasco+celofane foi superior, enquanto nos subcultivos dois e três o tratamento tubo+celofane se destacou. Para a hiperidricidade, no subcultivo

um, a combinação tubo+tampa foi a que apresentou menor hiperidricidade, no subcultivo dois os tratamentos tubo+PVC e tubo+tampa se destacaram, e no subcultivo três o melhor tratamento foi tubo+celofane. Na fase de alongamento (Experimento quatro), a combinação tubo+celofane foi a que apresentou maior altura média de explantes. Nos três subcultivos, não ocorreu hiperidricidade na combinação frasco+celofane, sendo também nessa combinação observado o maior peso de matéria seca. No experimento cinco, o tratamento  $0,75 \text{ mg L}^{-1}$  BAP apresentou o maior número de brotações, nos dois subcultivos. Para a hiperidricidade, em ambos subcultivos, o BAP apresentou plantas com menor nível de hiperidricidade. Conclui-se que, na germinação de sementes de *Eremanthus incanus*, o meio WPM com 75% de sais e vitaminas é o mais indicado, enquanto para o estabelecimento da cultura o melhor é o MS 75%. O tipo de recipiente e vedação influenciam na multiplicação, no alongamento e na hiperidricidade dos explantes, sendo que a combinação do recipiente tubo de ensaio com a vedação papel celofane transparente proporcionou, em geral, os melhores resultados. Quando comparadas as citocininas BAP e TDZ na multiplicação, indica-se  $0,75 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. Mais estudos envolvendo a propagação in vitro devem ser realizados, principalmente relacionados às etapas de enraizamento e aclimação, de forma a consolidar uma metodologia para *E. incanus*.

Palavras-Chave: Cultura de Tecidos; Espécie Nativa; Recipientes; Vedações.

## ABSTRACT

This study aimed to develop procedures for in vitro propagation of *Eremanthus incanus* and control the vitrification in explants during cultivation. Five experiments were carried out, involving the stages of germination, multiplication and stretching. In experiment 1, we evaluated the influence of culture medium MS and WPM (25, 50, 75 and 100% of salts and vitamins) in the percentage of germination and height, number of leaves and dry weight of the produced seedlings. The experiments 2, 3 and 4 treatments consisted of two types of containers (test tubes and culture vials) and four types of sealing (PVC film, cellophane, micropore tape and specific covers). In experiment 2, we evaluated the influence of the containers and sealing forms on the percentage of germination and contamination, height, number of leaves and dry weight of seedlings. In experiment 3, we evaluated the number of shoots and vitrification in explants in multiplication phase in three subcultures. In the experiment 4, the elongation phase was assessed according to the containers and sealing forms in relation to height variables, vitrification and dry matter weight. In experiment 5, four concentrations of BAP and TDZ were tested and the number of shoots, vitrification and callus were evaluated in two subcultures. In experiment 1, the culture medium WPM75 had the highest percentage of germination, while the MS75 medium showed higher height and number of leaves, and the WPM100 presented the greater weight of dry matter. In experiment 2, the combinations tube + tape, PVC pipe + tube and PVC + vial provided the highest percentage of germination, while the lowest percentage of contamination were observed in the treatments tube + tape and tube + cover. The tube combination tube + cellophane showed higher height and dry matter weight, and vial + PVC larger number of leaves. It was observed in the experiment 3, in relation with the number of sprouts, that in the subculture 1 the combination vial + cellophane was superior, while in subcultures 2 and 3 the treatment tube + cellophane stood out. For vitrification, in subculture 1 the combination tube + cover showed the lowest vitrification, in subculture 2 the treatments tube + PVC tube and cover + tube stood out, and in subculture 3 the best treatment was tube + cellophane. In the elongation phase (Experiment 4), the combination tube + cellophane showed the highest average height of explants. In the three subcultures, there was no vitrification in combination vial + cellophane, also being observed in this combination the greater weight of dry matter. In experiment 5, treatment 0.75 mg L<sup>-1</sup> BAP had the highest number of shoots in the two subcultures. For vitrification, in both subcultures, BAP presented plants with lower vitrification. In conclusion, for the



germination of *Eremanthus incanus* seeds, WPM medium with 75% of salts and vitamins is the most suitable, while for crop establishment the best medium is MS 75%. The type of container and sealing influence the multiplication, on elongation and vitrification of explants, being that the combination of the test tube container with transparent cellophane sealing provided, in general, the best results. When comparing the cytokinins BAP and TDZ in proliferation it is indicated 0.75 mg L<sup>-1</sup> BAP. Further studies involving the in vitro propagation must be carried out, mainly related to steps of rooting and acclimatization to consolidate a methodology for *E. incanus*.

**Keywords:** Plant Tissue Culture; Native Species; Containers; Sealings.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> A) Tubos de ensaio com os diferentes tipos de vedações; B) Frasco com os diferentes tipos de vedações. I= tampas específicas; II= fita microporosa; III= película de PVC e IV= papel celofane. ....	<b>21</b>
<b>Figura 2-</b> Percentuais de germinação de <i>E. incanus</i> ao longo do tempo, em respostas aos diferentes tipos de meio e concentrações. ....	<b>25</b>
<b>Figura 3-</b> Percentuais de germinação de <i>E. incanus</i> , em respostas aos meios MS e WPM em diferentes concentrações, aos 28 dias.....	<b>25</b>
<b>Figura 4-</b> Médias das alturas dos explantes de <i>E. incanus</i> , em função de diferentes tipos de meio de cultura e concentrações. ....	<b>26</b>
<b>Figura 5-</b> Altura média dos explantes de <i>E. incanus</i> , aos 75 dias submetidos aos meios MS e WPM em diferentes concentrações.....	<b>26</b>
<b>Figura 6-</b> Médias do número de folhas dos explantes de <i>E. incanus</i> , em respostas aos meios MS e WPM em diferentes concentrações ao longo do tempo. ....	<b>27</b>
<b>Figura 7-</b> Número de folhas por explantes de <i>E. incanus</i> , em respostas a diferentes tipos de meio de cultura e concentrações. ....	<b>27</b>
<b>Figura 8-</b> Matéria seca dos explantes de <i>E. incanus</i> , em respostas aos meios MS e WPM em diferentes concentrações, aos 75 dias.....	<b>28</b>
<b>Figura 9-</b> Percentual de germinação de <i>E. incanus</i> em respostas a diferentes tratamentos de recipientes e vedações, aos 35 dias. Tratamentos apresentando a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o Teste de Tukey, a 5% de significância.....	<b>29</b>
<b>Figura 10-</b> Evaporação do meio de cultura no tratamento frasco+fita. ....	<b>29</b>
<b>Figura 11-</b> Explantes de <i>E. incanus</i> com presença de estruturas fúngicas (A) e exsudação bacteriana (B).....	<b>30</b>
<b>Figura 12-</b> Altura média dos explantes de <i>E. incanus</i> , em respostas a diferentes tratamentos de recipientes e vedações, aos 35 dias. ....	<b>31</b>
<b>Figura 13-</b> Número médio de folhas de <i>E. incanus</i> , em respostas a diferentes tipos de recipientes e vedações, aos 35 dias.....	<b>32</b>
<b>Figura 14-</b> Matéria seca de explantes de <i>E. incanus</i> , em respostas a diferentes tipos de recipientes e vedações, aos 35 dias.....	<b>32</b>

<b>Figura 15-</b> Número médio de brotações dos explantes de <i>E. incanus</i> em três subcultivos sucessivos (SUB1, SUB2 e SUB3). .....	<b>33</b>
<b>Figura 16-</b> Classificação da hiperidricidade em explantes de <i>E. incanus</i> . A) 0= Inexistente B) 1= Inicial C) 2= Médio D) 3= Avançado.....	<b>34</b>
<b>Figura 17-</b> Hiperidricidade em explantes de <i>E. incanus</i> em função dos recipientes e vedações, em três subcultivos.....	<b>35</b>
<b>Figura 18-</b> Altura dos explantes de <i>E. incanus</i> , em três subcultivos em resposta a diferentes tipos de recipientes e vedações. ....	<b>36</b>
<b>Figura 19-</b> Hiperidricidade em explantes de <i>E. incanus</i> em três subcultivos, em resposta a diferentes tipos de recipientes e vedações. ....	<b>37</b>
<b>Figura 20-</b> Peso de matéria seca de <i>E. incanus</i> em respostas aos tipos de recipientes e vedações, na fase de alongamento de explantes. ....	<b>37</b>
<b>Figura 21-</b> Explantes enraizados durante o alongamento, em resposta a diferentes tipos de recipientes e vedações.....	<b>38</b>
<b>Figura 22-</b> Número de brotações por explantes de <i>E. incanus</i> , em resposta a diferentes concentrações de citocininas, no SUB1.....	<b>39</b>
<b>Figura 23-</b> Número de brotações em explantes de <i>E. incanus</i> , em resposta a diferentes tipos de citocininas e concentração no SUB2.....	<b>39</b>
<b>Figura 24-</b> Hiperidricidade em explantes de <i>E. incanus</i> em resposta a diferentes tipos de citocininas e concentração, em dois subcultivos sucessivos.....	<b>40</b>
<b>Figura 25-</b> Classificação de calosidade em explantes de <i>E. incanus</i> . A) 0= Inexistente B) 1= Baixa C) 2= Média D) 3= Alta.....	<b>41</b>
<b>Figura 26-</b> Nível de calosidade em explantes de <i>E. incanus</i> , em resposta a diferentes tipos de citocininas e concentração. ....	<b>42</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição do meio de cultura MS e WPM utilizado para a inoculação de propágulos de <i>E. incanus</i> .....	<b>20</b>
<b>Tabela 2:</b> Resultado da análise de variância para o percentual de germinação de <i>Eremanthus incanus</i> , aos 28 dias, em respostas a diferentes tipos e concentrações de meio de cultura. ....	<b>24</b>
<b>Tabela 3:</b> Resultados da análise de variância para o percentual de germinação de <i>E. incanus</i> em função de diferentes tipos de recipiente e vedações, aos 35 dias.....	<b>29</b>
<b>Tabela 4:</b> Resultado da análise de variância para contaminação dos explantes de <i>E. incanus</i> em função de diferentes tipos de recipientes e vedações .....	<b>30</b>
<b>Tabela 5:</b> Percentual médio de contaminação dos explantes de <i>E. incanus</i> em função de diferentes tipos de recipientes e vedações .....	<b>30</b>
<b>Tabela 6:</b> Resultados da análise de variância para altura, número de folhas e matéria seca dos explantes de <i>E. incanus</i> em função de diferentes tipos de recipientes e vedações.....	<b>31</b>
<b>Tabela 7:</b> Resultados da análise de variância para o número de brotações dos explantes de <i>E. incanus</i> em três subcultivos ( SUB1, SUB2, e SUB3 ), em função de diferentes tipos de recipientes e vedações.....	<b>33</b>
<b>Tabela 8:</b> Resultados da análise de variância para a hiperidricidade nos explantes de <i>E. incanus</i> em três subcultivos ( SUB1, SUB2, e SUB3 ), em função de diferentes tipos de recipientes e vedações .....	<b>34</b>
<b>Tabela 9:</b> Hiperidricidade em explantes de <i>E. incanus</i> em função de diferentes tipos de recipientes e vedações, no subcultivo 2.....	<b>34</b>
<b>Tabela 10:</b> Resultados da análise de variância para altura dos explantes de <i>E. incanus</i> em três subcultivos, em resposta aos diferentes tipos de recipientes e vedações.....	<b>35</b>
<b>Tabela 11:</b> Resultados da análise de variância para a hiperidricidade em explantes de <i>E. incanus</i> em três subcultivos, em resposta a diferentes tipos de recipientes e vedações .	<b>36</b>
<b>Tabela 12:</b> Resultados da análise de variância para o número de brotações em explantes de <i>E. incanus</i> em dois subcultivos em resposta a diferentes tipos de citocininas e concentrações.....	<b>38</b>
<b>Tabela 13:</b> Número de brotações por explantes de <i>E. incanus</i> , em função de diferentes citocininas, no subcultivo 1 .....	<b>39</b>

**Tabela 14:** Resultados da análise de variância para hiperidricidade em explantes de *E. incanus* em dois subcultivos em resposta a diferentes tipos de citocininas e concentrações..... **40**

**Tabela 15:** Hiperidricidade em explantes de *E. incanus*, em resposta a diferentes tipos de citocininas, em dois subcultivos (SUB1 e SUB2) ..... **40**

**Tabela 16:** Resultados da análise de variância para calosidade em explantes de *E. incanus* no segundo subcultivo, em resposta a diferentes tipos de citocininas e concentrações..... **41**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
2.1. Material vegetal .....	18
2.1.1. Desinfestação e seleção das sementes .....	18
2.1.2. Estabelecimento de culturas assépticas e condições de cultivo.....	19
2.2. Experimento 1: Germinação de sementes de <i>E. incanus</i> em diferentes concentrações do meio MS e WPM .....	19
2.3. Experimento 2: Influência do tipo de recipiente e vedação na germinação de <i>E. incanus</i> .....	211
2.4. Experimento 3: Efeito de diferentes recipientes e vedações na multiplicação de <i>E. incanus</i> .....	22
2.5. Experimento 4: Efeito de diferentes recipientes e vedações no alongamento de <i>E. incanus</i> .....	22
2.6. Experimento 5: Efeito das citocininas Benzilaminopurina e Thidiazuron na multiplicação de <i>E. incanus</i> .....	23
2.7. Análise de dados.....	24
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
3.1. Experimento 1: Germinação de sementes de <i>E. incanus</i> em diferentes concentrações do meio MS e WPM .....	24
3.2. Experimento 2: Influência do tipo de recipiente e vedação na germinação de <i>E. incanus</i> .....	28
3.3. Experimento 3: Efeito de diferentes recipiente e vedações na multiplicação de <i>E. incanus</i> .....	33
3.4. Experimento 4: Efeito de diferentes recipientes e vedações no alongamento de <i>E. incanus</i> .....	35
3.5. Experimento 5: Efeito das citocininas Benzilaminopurina e Thidiazuron na multiplicação de <i>E. incanus</i> .....	38
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>46</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>47</b>

## 1. Introdução

O gênero *Eremanthus* pertence à família Asteraceae, compreende 18 espécies, entre árvores e arbustos, que são conhecidas como candeias (PÁDUA, 2011). A candeia, *Eremanthus incanus* (Less.) Less, é uma árvore de porte que varia de 2 a 10 m de altura e pode atingir até 20 cm de diâmetro. A espécie é comum em Minas Gerais, com distribuição do sudeste ao nordeste do Planalto Central do Brasil. A altitude predominante varia de 800 a 1200 m, ocorre no cerrado, na floresta secundária ou na caatinga (SCOLFORO et al., 2002).

É uma espécie muito utilizada para produção de moirões, já que apresenta menor produtividade do óleo alfabisabolol quando comparada a outras espécies do gênero (SCOLFORO et al., 2002). O alfabisabolol exibe propriedades antiflogísticas, antibacterianas, antimicóticas, dermatológicas e espasmódicas (TEIXEIRA et al., 1996) e devido a essas propriedades é empregado pelas indústrias cosméticas e farmacêuticas (SCOLFORO et al., 2012).

A boa qualidade da madeira e a produção do óleo alfabisabolol agrega valor econômico à candeia, portanto, é necessário encontrar uma forma de propagá-la com o intuito de produzir mudas com qualidade, livre de patógenos, favorecendo a conservação da espécie e auxiliando em futuros programas de melhoramento. ROSAL et al. (2007) afirmam que a multiplicação eficiente e preservação de plantas valiosas, tais como a candeia, pode ser alcançado por meio da técnica de micropropagação.

A micropropagação permite o crescimento e a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta, em meio artificial, em condições de luminosidade, temperatura e fotoperíodo controlados. Baseia-se no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de se produzir órgãos ou embriões (CARVALHO et al, 2006).

Ao se excisar parte da planta para o cultivo *in vitro*, sabe-se que os explantes não são completamente autotróficos e requerem meio nutritivo para suplementar suas necessidades exógenas, em termos de elementos essenciais, constituintes orgânicos e energia (TORRES et al., 2001).

Os meios de cultura devem fornecer as substâncias essenciais que favoreça o crescimento dos tecidos, e que controla em sua maior parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas

são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos como a fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células. Sendo assim, os meios de cultura baseiam-se em exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas. Complementando as substâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados ao meio para suprirem as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (CALDAS et al., 1998).

Várias formulações de meios básicos têm sido utilizadas. Entretanto, não há uma formulação padrão, mas o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suas modificações e diluições tem mostrado bons resultados para diversas espécies. Porém, em alguns casos em espécies lenhosas, o meio MS não se mostrou satisfatório, e composições mais diluídas em macronutrientes tiveram maior desempenho (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O meio WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) tem sido muito utilizado para espécies lenhosas, uma vez que apresenta 25% das concentrações de íons nitrato e amônia em relação ao meio MS e um alto nível de íons sulfato (PASQUAL, 2001). Segundo George (1996), esta diferença no conteúdo total de  $N_2$  no meio é importante quando se procura um meio adequado para as diferentes espécies de plantas e tipos de cultura, pois se trata de um fator determinante para o crescimento e morfogênese. A ótima concentração de cada nutriente do meio de cultura, para alcançar taxas de crescimento máximas, varia consideravelmente dependendo da espécie, do tipo de cultura, entre outros (QUISEN; ANGELO, 2008).

O sucesso da micropropagação depende do controle de um grande número de variáveis e não de um único fator. Deve-se considerar o manejo da planta matriz, as características dos explantes utilizados, o procedimento de subcultura adotado, as condições ambientais e o microambiente dentro do frasco de cultura, além do transplântio. Uma vez que cada espécie apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos, as necessidades para seu cultivo *in vitro* também tendem a ser únicas (Grattapaglia; Machado, 1998).

O entendimento da influência de fatores como, qualidade fitossanitária e fisiológica de sementes, tipo de meio de cultura, tipos de explantes cultivado, concentração e tipo de regulador de crescimento, entre outros, (GOLLE et al., 2014; SARTOR et al., 2013; GUTIÉRREZ et al., 2013; ALMEIDA et al. 2015) quando



estudados isoladamente ou associado a outras variáveis, podem vir a favorecer a propagação *in vitro* e colaborar para a determinação de um protocolo eficiente de micropropagação para a espécie de interesse.

Uma desordem em qualquer destes fatores pode resultar em alterações morfofisiológicas prejudiciais ao desenvolvimento da planta (PALMA, 2011), como por exemplo, a presença de hiperidricidade, antes conhecida pelo termo vitrificação.

O termo vitrificação foi usado pela primeira vez na cultura de tecidos vegetais por Debergh et al. (1981) para descrever uma aparência morfológica de órgãos ou tecidos, particularmente folhas, que se apresentavam com excesso de água, translúcido e "vítreo" (DEBERGH et al., 1992).

A hiperidricidade pode ser encontrada em todos os tecidos cultivados *in vitro*, podendo surgir como resultado de diferentes condições de estresse (GEORGE, 1996). Vários são os fatores que poderão induzir a hiperidricidade como, por exemplo, o microambiente dentro do recipiente de cultivo, condições de trocas gasosas, acumulação excessiva do gás etileno, agente gelificante, componentes do meio, reguladores de crescimento (SAHER et al., 2004; TSAY et al., 2006; IVANOVA & STADEN, 2009; PERERA et al., 2011; Yu et al., 2011; QUIALA et al., 2014). No entanto, muitos desses fatores só irão induzir à hiperidricidade quando outras condições no sistema de cultivo (meio, recipiente, ambiente, explante) não são otimizados (DEBERGH et al., 1992).

A presença de hiperidricidade, entre outros fatores, podem afetar os dois principais processos realizados pelas folhas: fotossíntese e troca gasosa (Ziv, 1986). Podendo ainda interferir nas atividades enzimáticas e nos processos metabólicos da planta (PIQUERAS, A. et al., 2002; SAHER et al., 2004; HASSANNEJAD et al., 2012; TABART et al., 2015).

As plantas hiperídricas apresentam características como folhas grossas, podendo ser muito alongadas, enrugadas ou onduladas; os caules das plântulas são mais largos em espessura de diâmetro; os comprimentos dos entrenós são mais curtos do que as de plantas aparentemente normais; apresentam baixo percentual ou ausência de enraizamento (KEVERS et al., 2004). Seus órgãos e tecidos são translúcidos, em alguns casos, menos verdes, facilmente quebráveis (CRÈVECOEUR et al., 1987). Além disso, apresentam redução de lignina e celulose, diminuição de clorofila, translucidez e presumivelmente menor capacidade fotossintética, (KEVERS et al., 2004), e funcionamento inadequado dos estômatos (ZIV; ARIEL 1988).

O controle da hiperidricidade tem sido aprimorado pelo ajuste das condições internas e externas do meio de cultivo (PALMA et al., 2011). O processo de hiperidricidade pode ser considerado como reversível, porém isso não significa que folhas hiperídricas já formadas e maduras revertam para uma estrutura normal e sobreviva ao processo de aclimação, mas significa que novos brotos ou folhas formadas por explantes hiperídricos, após serem transferidos para condições que não induzam a hiperidricidade, podem ter uma morfologia e anatomia próxima as de plantas sem hiperidricidade (KEVERS et al., 2004).

Durante o cultivo *in vitro*, *Eremanthus incanus* vem apresentando alterações morfológicas que são causadas devido à hiperidricidade e que são prejudiciais ao seu crescimento e desenvolvimento. Diante deste contexto, o objetivo do trabalho foi desenvolver procedimentos de micropropagação e controlar a hiperidricidade, na espécie durante o cultivo *in vitro*.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Material vegetal**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Melhoramento Florestal, do Departamento de Engenharia Florestal, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, em Diamantina, Minas Gerais, entre fevereiro e outubro de 2015.

As sementes foram coletadas em novembro de 2014, em uma área de um antigo lixão situada nos limites da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri-Campus JK (18°12'17" de latitude Sul e 43°34'08" de longitude Oeste). O beneficiamento foi feito manualmente e, em seguida, foram armazenadas em câmara fria, sob temperatura de 6°C e 40% de umidade até a instalação dos experimentos.

#### **2.1.1. Desinfestação e seleção das sementes**

Realizou-se uma desinfestação, em que as sementes foram imersas em solução de fungicida Cuprocarb 500<sup>®</sup> (1 g L<sup>-1</sup>) durante 15 minutos. Logo após, foram imersas em álcool 70% por 30 segundos, e em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% adicionada de cinco gotas de Tween 20 para cada 100 mL de solução durante 10 minutos e enxaguadas em água deionizada e autoclavada.

As sementes foram selecionadas por meio de método densimétrico, de forma que, quando imersas em solução de hipoclorito de sódio algumas ficaram imersas e outras ficaram submersas, e somente as que ficaram submersas foram utilizadas nos experimentos.

### **2.1.2. Estabelecimento de culturas assépticas e condições de cultivo**

A inoculação do material vegetal foi realizada em câmara de fluxo laminar. Em todos os experimentos o meio de cultura foi enriquecido com 100 mg L<sup>-1</sup> de Mio-Inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar MERCK®. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,02, antes da inclusão do ágar, e autoclavado por 15 minutos à temperatura de 121°C e pressão de 1 atm.

As concentrações de ácido naftalenoacético e benzilaminopurina utilizadas no experimento três e de ácido giberélico utilizadas no experimento quatro, foram definidas de acordo com a metodologia estabelecida por Miranda (2015).

Os experimentos foram mantidos em sala de cultura, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2° C e intensidade luminosa de 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### **2.2. Experimento 1: Germinação de sementes de *E. incanus* em diferentes concentrações do meio MS e WPM**

As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio com tampas de Kimble em polietileno contendo 10 mL de meio de cultura. Os tratamentos foram constituídos por dois tipos de meio de cultura, MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980), especificados de acordo com a Tabela 1, nas concentrações de 25, 50, 75 e 100% dos sais e vitaminas, totalizando oito tratamentos: MS25, MS50, MS75, MS100, WPM25, WPM50, WPM75 e WPM100. Todos os tratamentos foram suplementados de acordo com o item 2.1.2 e sem adição de reguladores de crescimento.

**Tabela 1:** Composição do meio de cultura MS e WPM utilizado para a inoculação de propágulos de *E. incanus*

Composto	Fórmula Química	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	
		MS	WPM
Macronutrientes			
Nitrato de Amônio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650,00	400
Nitrato de Potássio	KNO <sub>3</sub>	1.900,00	
Cloreto de Cálcio	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	96
Sulfato de Potássio	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		990
Nitrato de Cálcio	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O		556
Fosfato de Potássio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170
Sulfato de Magnésio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	370
Micronutrientes			
ÁcidoBórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2
Molibdato de Sódio	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25
Cloreto de Cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	
Sulfato de Manganês	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9	22,3
Sulfato de Zinco	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6
Sulfato de Cobre	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,25
Iodeto de Potássio	KI	0,83	
FeEDTA			
Sódio EDTA	Na <sub>2</sub> E.D.T.A.	37,2	37,2
Sulfato de Ferro	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	27,8	27,8
Vitaminas			
ÁcidoNícotínico		0,5	0,5
Piridoxina.HCL		0,1	0,5
Tiamina.HCL		0,1	1
Glicina		2	2

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2x4 (dois tipos de meio e quatro concentrações), com cinco repetições, cinco tubos por repetição e uma semente por tubo.

Avaliou-se o percentual de germinação uma vez por semana durante 28 dias. A altura, o número de folhas e a hiperidricidade nas plântulas germinadas foram avaliados aos 30, 45, 60 e 75 dias.

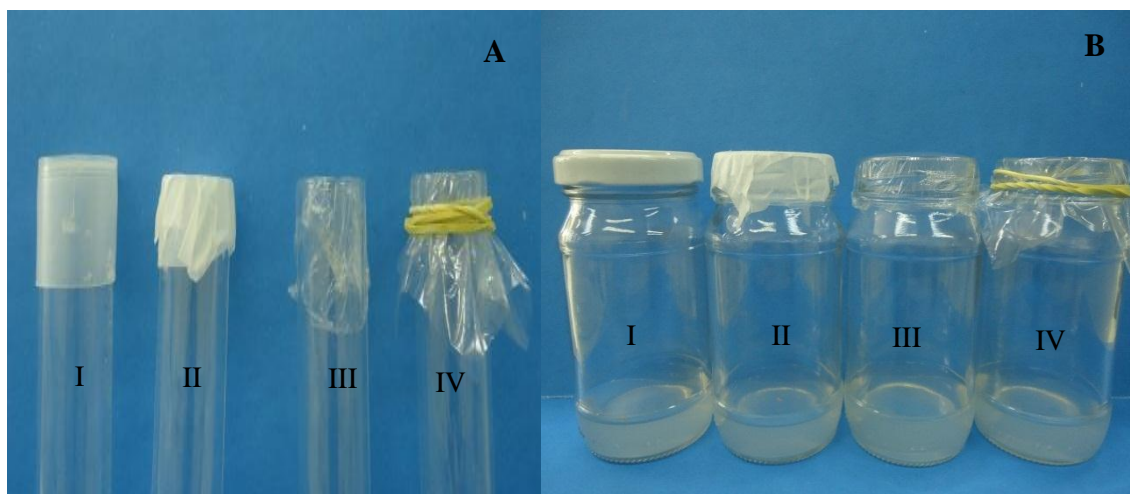
Para avaliação a hiperidricidade os explantes foram classificados em escala, onde: explantes que não apresentavam nenhuma alteração morfológica foram classificados com hiperidricidade 0=inexistente, já os que apresentavam folhas mais alongadas e/ou enroladas foram classificados com hiperidricidade 1= inicial. Os explantes que apresentavam folhas

enrugadas e coloração verde mais claro foram classificados como 2= médio e aqueles que apresentavam túrgidos e atrofiados foram classificados como 3= avançado.

Aos 75 dias, realizou-se a secagem das plântulas em estufa a 60°C por 72 horas para a avaliação do peso de matéria seca.

### 2.3. Experimento 2: Influência do tipo de recipiente e vedação na germinação de *E. incanus*

Foram testados dois tipos de recipientes, sendo tubos de ensaio (2,3 cm de diâmetro x 15 cm de altura) com capacidade para 57 mL em que foram vertidos 10 mL de meio e frascos de cultura (5,5cm de diâmetro x 8,5cm de altura) com capacidade de 160 ml em que foram vertidos 30 mL de meio; e quatro tipos de vedação: duas camadas de fita microporosa CREMER®, uma camada de película de PVC ALPFILM® e uma camada de papel celofane transparente que foram comuns para os dois tipos de recipientes e tampas específicas para cada tipo de recipiente, sendo para os tubos de ensaio tampas de kimble em polietileno autoclavável e para os frascos de cultura tampas brancas de metal (Figura 1).



**Figura 1:** A) Tubos de ensaio com os diferentes tipos de vedações; B) Frasco com os diferentes tipos de vedações. I= tampas específicas; II= fita microporosa; III= película de PVC e IV= papel celofane.

O meio utilizado foi escolhido em função do percentual de germinação obtido no experimento um, sendo o WPM com 75% de sais e vitaminas e sem adição de reguladores de crescimento.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com oito tratamentos (combinações dos tipos de recipientes e vedações), com 4 repetição, 5 recipientes por repetição e uma semente por recipiente.

O percentual de germinação, de contaminação e a hiperidricidade (baseado nos critérios citados no item 2.2), foram observados, uma vez por semana, durante 35 dias. A altura e o número de folhas foram avaliados aos 35 dias, quando se realizou também a secagem das plântulas em estufa a 60°C por 72 horas para a avaliação do peso de matéria seca.

#### **2.4. Experimento 3: Efeito de diferentes recipientes e vedações na multiplicação de *E. incanus***

Os explantes utilizados foram segmentos nodais com idade de 30 dias provenientes de um subcultivo *in vitro* em meio MS, com 75% de sais e vitaminas, suplementado de acordo com o item 2.1.2 e acrescido de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (benzilaminopurina) e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético), realizado em tubos de ensaio vedados com tampas de *kimble*. Esta mesma composição do meio de cultura foi utilizada nos subcultivos do presente experimento.

Os tratamentos consistiram das quatro melhores combinações de recipientes determinadas pelo experimento dois, sendo: tubo + tampa de *kimble* em polietileno, tubo + celofane, tubo + PVC e frasco + celofane.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (combinações dos tipos de recipientes e vedações), com quatro repetições, cinco recipientes por repetição e um explante por recipiente.

A avaliação foi realizada em três subcultivos sucessivos, com intervalos de 30 dias, e a cada subcultivo foi avaliado o número de brotações e a hiperidricidade (baseado nos critérios citados no item 2.2).

#### **2.5. Experimento 4: Efeito de diferentes recipientes e vedações no alongamento de *E. incanus***

Os explantes utilizados foram segmentos nodais com idade de 30 dias multiplicados *in vitro* em meio MS, com 75% de sais e vitaminas, suplementado de acordo com o item 2.1.2 e acrescido de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (benzilaminopurina) e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético), realizado em tubos de ensaio vedados com tampas de *kimble*.

Os tratamentos consistiram nas combinações de recipientes e vedações: tubo + tampa de *kimble* em polietileno, tubo + celofane, tubo + PVC e frasco + celofane. Utilizou-se

o meio MS 75% de sais e vitaminas, suplementado e acrescido de  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  (ácido giberélico).

O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (combinações dos tipos de recipientes e vedações), com quatro repetições e cinco recipientes por repetição e um explante por recipiente.

Realizaram-se três subcultivos sucessivos, em intervalos de 30 dias, e a cada subcultivo foram avaliadas a altura dos explantes e a hiperidricidade (critérios citados no item 2.2). Após 90 dias de instalação do experimento, foi avaliado o peso de matéria seca dos explantes, de acordo com a metodologia citada no item 2.3.

## **2.6. Experimento 5: Efeito das citocininas Benzilaminopurina e Thidiazuron na multiplicação de *E. incanus***

Os explantes utilizados foram provenientes de segmentos nodais com idade de 30 dias, multiplicados *in vitro* em meio MS com 75% de sais e vitaminas suplementado de acordo com o item 2.1.2 e acrescido de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP (benzilaminopurina) e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA (ácido naftalenoacético), realizado em tubos de ensaio vedados com tampas de *kimble*.

O meio utilizado para o experimento foi o MS 75%, suplementado e acrescido de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, utilizaram-se tubos de ensaio vedados com tampas de *kimble* contendo 10 mL de meio de cultura. Os tratamentos foram constituídos de quatro concentrações de BAP e quatro concentrações de TDZ (Thidiazuron), sendo 0,25; 0,5; 0,75 e  $1 \text{ mg L}^{-1}$ .

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial  $2 \times 4$  (dois tipos de citocininas e quatro concentrações), com quatro repetições por tratamento e cinco tubos por repetição e um explante por tubo.

Realizaram-se dois subcultivos sucessivos, em intervalos de 30 dias, e a cada subcultivo foi avaliado o número de brotações e a hiperidricidade (critérios citados no item 2.2).

No segundo subcultivo, avaliou-se a calosidade dos explantes, utilizando uma escala de notas, de forma que quando os explantes não apresentavam calosidade eram classificados como 0= inexistente, quando a calosidade alcançava até 25% do diâmetro do tubo de ensaio era classificada como 1=baixa, quando alcançava de 25% a 50% do diâmetro

do tubo de ensaio era considerada 2= média e acima de 50% do diâmetro classificada como 3= alta.

## 2.7. Análise de dados

Os dados obtidos em cada experimento foram submetidos aos testes de normalidade de resíduos (Lilliefors) e de homogeneidade de variâncias (Cochran) e, no caso em que não atenderam às pressuposições, foram transformados. Posteriormente procedeu-se com a análise de variância, teste de médias, análise de regressão e estatística descritiva, utilizando o *software Statistica 10.0* (STATSOFT, 2010).

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Experimento 1: Germinação de sementes de *E. incanus* em diferentes concentrações do meio MS e WPM

O resultado da análise de variância para o percentual de germinação, aos 28 dias, em resposta aos tratamentos não foi expressivo a 5% de significância (Tabela 2). Aos sete dias após a inoculação, os tratamentos MS50, MS100 e o WPM100 não apresentaram sementes germinadas, enquanto no tratamento WPM25 houve o maior percentual de germinação, igual a 12%. Aos 14 dias, ainda não havia sementes germinadas no tratamento MS50, enquanto que nos meios MS75, WPM50 e WPM75 a germinação era de 28%.

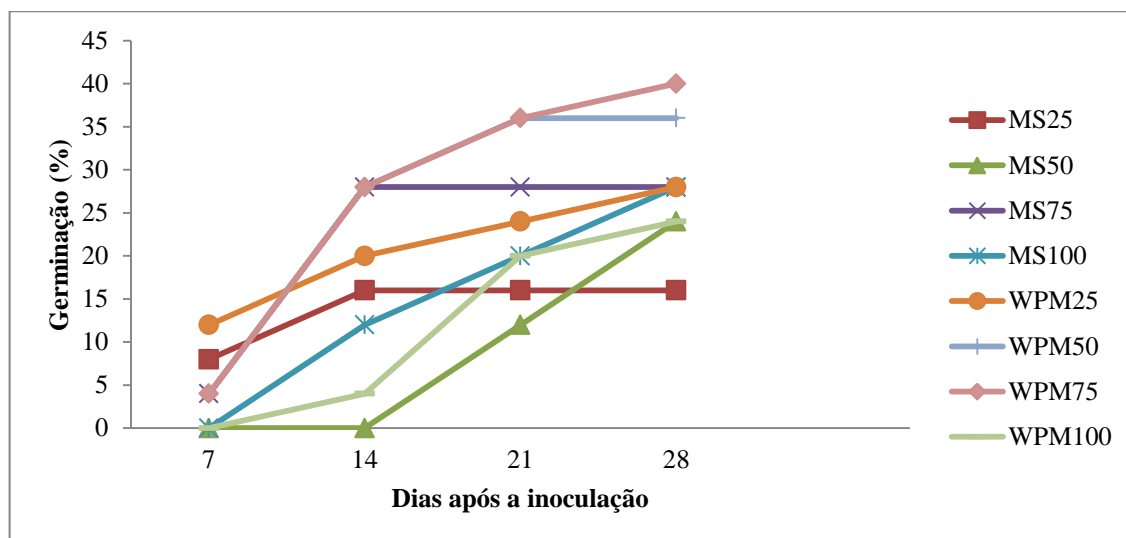
Aos 21, a germinação sob o tratamento MS50 foi igual a 12%, sendo o menor valor observado, já os maiores percentuais de germinação foram encontrados nos tratamentos WPM50 e WPM75, sendo igual a 36%. Aos 28 dias, o tratamento que apresentou o menor percentual de germinação foi o MS25, igual a 16% e o tratamento em que houve o maior percentual de germinação foi o WPM75 apresentando 40% de sementes germinadas (Figura 2).

**Tabela 2:** Resultado da análise de variância para o percentual de germinação de *Eremanthus incanus*, aos 28 dias, em respostas a diferentes tipos e concentrações de meio de cultura.

Fontes de variação	GL	QM
Meio de Cultura	1	640,00 <sup>ns</sup>
Concentração	3	266,67 <sup>ns</sup>
Meio* Concentração	3	160,00 <sup>ns</sup>
Resíduo	32	360,00
CV (%)		66,30

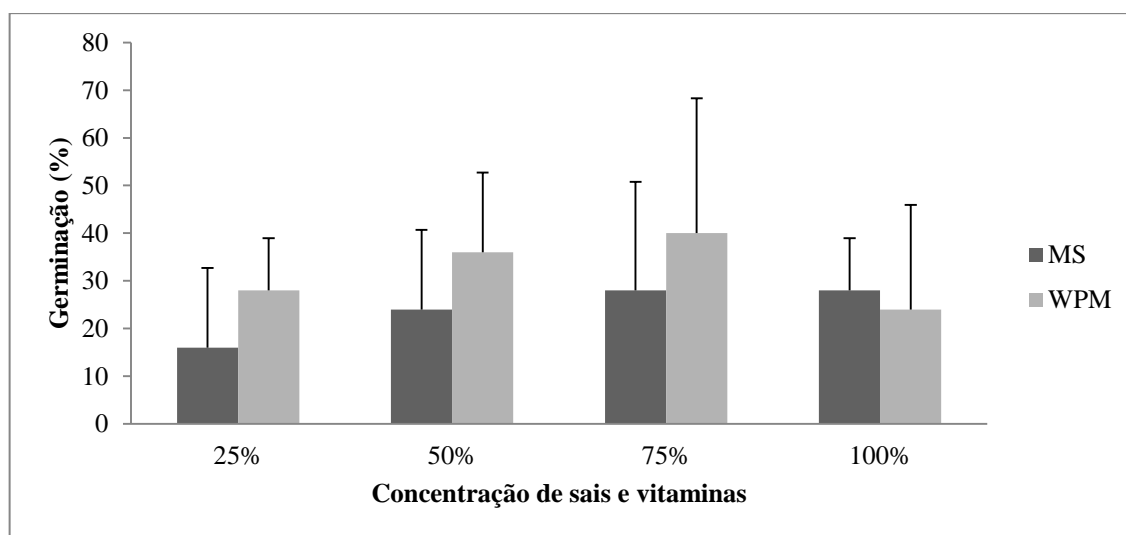
GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de variação; <sup>ns</sup> Diferença não expressiva a 5% de significância.





**Figura 2:** Percentuais de germinação de *E. incanus* ao longo do tempo, em respostas aos diferentes tipos de meio e concentrações.

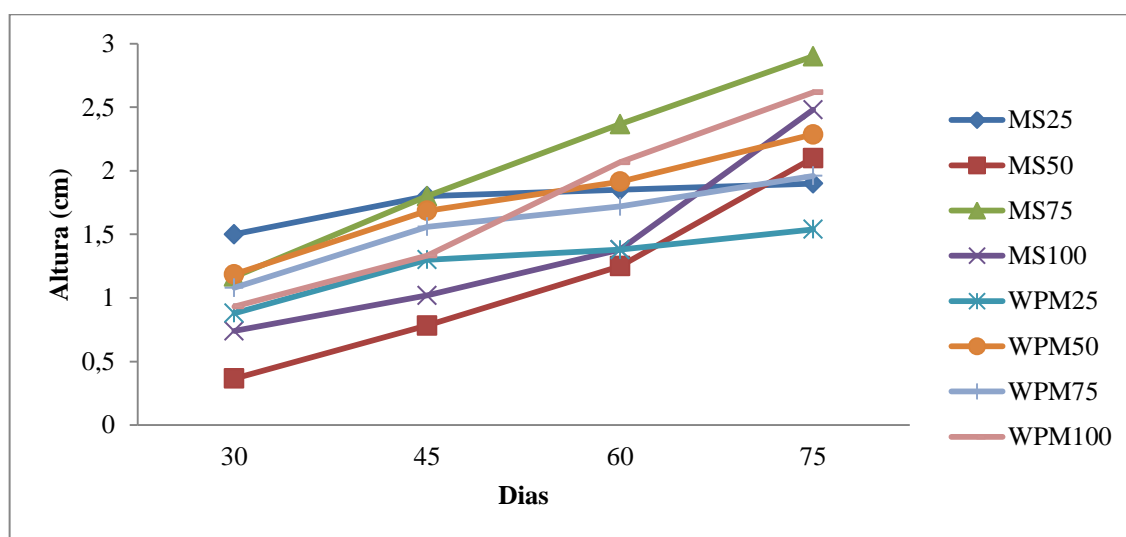
Sob o meio WPM, aos 28 dias, observou-se tendência de acréscimo do percentual de germinação em função das concentrações de sais e vitaminas até a concentração de 75%, sendo que a partir desta houve redução da germinação (Figura 3). Já para o meio MS, a tendência foi crescente até a concentração de 75%, e a partir desta houve estabilidade no percentual de germinação. Dentro de uma mesma concentração, o meio WPM foi sempre superior ao MS, com exceção observada na concentração de 100%.



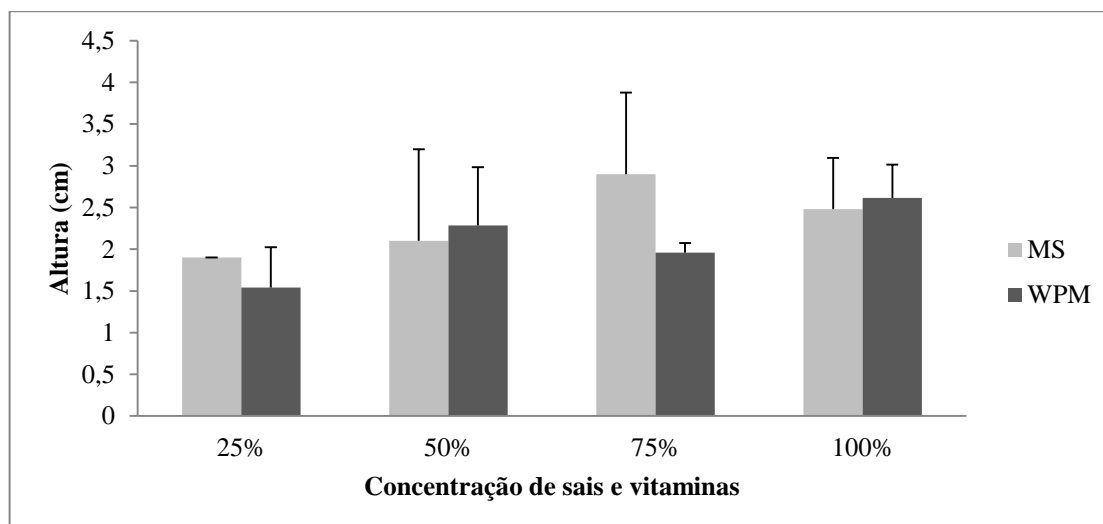
**Figura 3:** Percentuais de germinação de *E. incanus*, em respostas aos meios MS e WPM em diferentes concentrações, aos 28 dias.

Em função do baixo percentual de germinação, não foi possível a realização da análise de variância para a altura, número de folhas e peso de matéria seca. Assim, procedeu-

se com a análise descritiva dessas variáveis. Aos 30 dias, no tratamento MS25 se obteve a maior altura média, já a partir dos 60 dias de avaliação o tratamento MS75 se destacou dos demais, apresentando maior altura média dos explantes em relação aos outros tratamentos (Figura 4). Aos 75 dias, para os tratamentos do meio MS até a concentração de 75% houve tendência crescente, ocorrendo decréscimo na altura dos explantes na concentração de 100% de sais e vitaminas. Enquanto que, para os tratamentos do meio WPM, houve tendência crescente, com exceção da concentração 75%, em que ocorreu um decréscimo na altura média dos explantes (Figura 5).

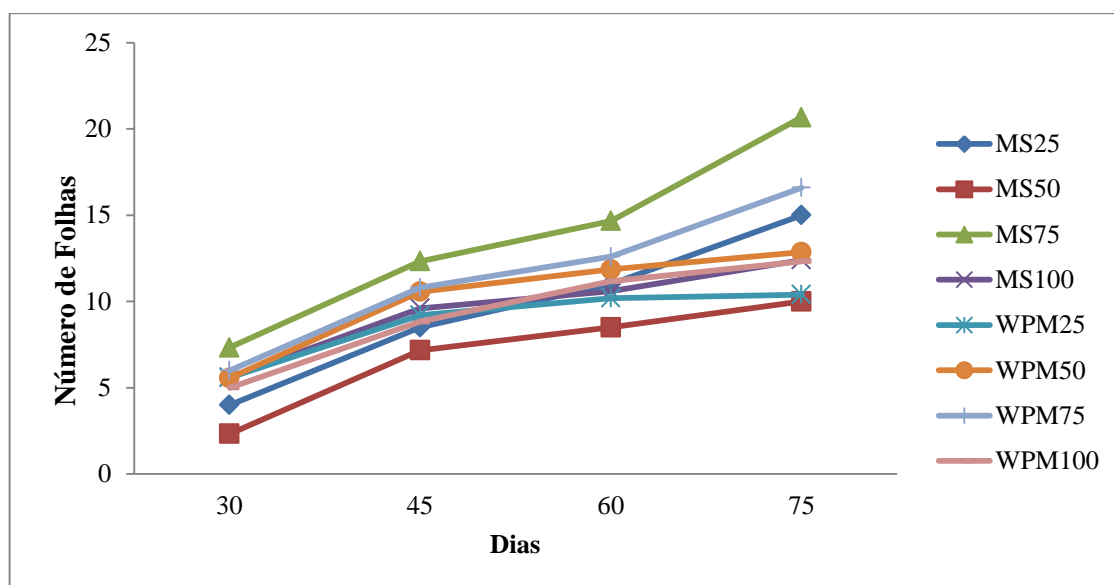


**Figura 4:** Médias das alturas dos explantes de *E. incanus*, em função de diferentes tipos de meio de cultura e concentrações.

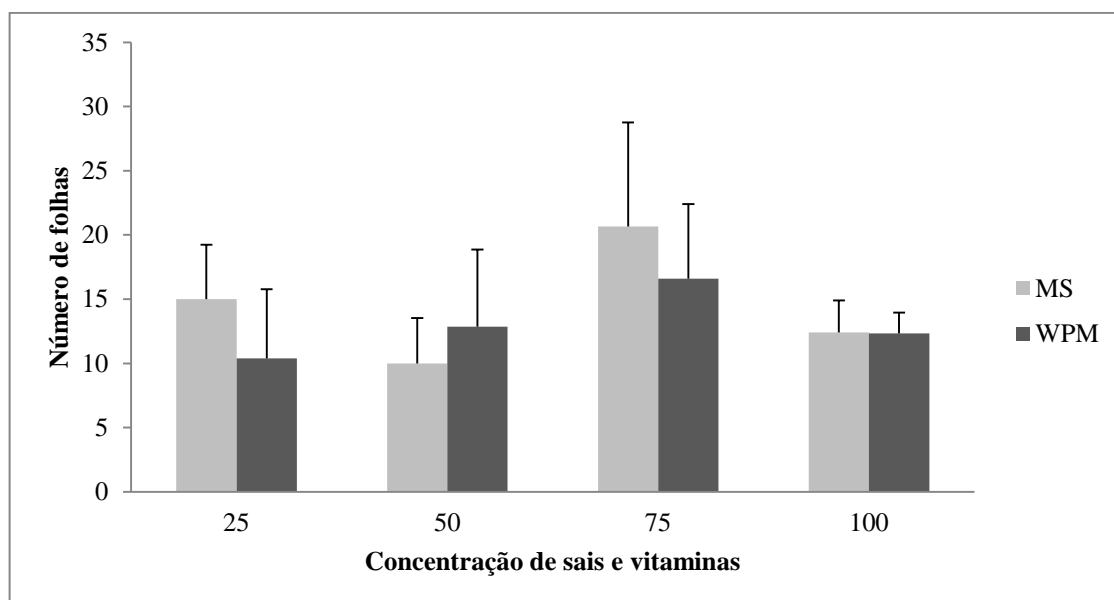


**Figura 5:** Altura média dos explantes de *E. incanus*, aos 75 dias submetidos aos meios MS e WPM em diferentes concentrações.

Para o número de folhas, o tratamento MS75 apresentou-se superior aos demais meios de cultura, ao longo do tempo de avaliação (Figura 6). Aos 75 dias, para o meio MS, observou-se decréscimo na concentração 50%, seguido por um aumento no número médio de folhas na concentração 75% em que se obteve maior valor médio, sendo igual a 20,67, enquanto para o meio WPM houve tendência crescente no número de folhas até a concentração 75% (Figura 7).



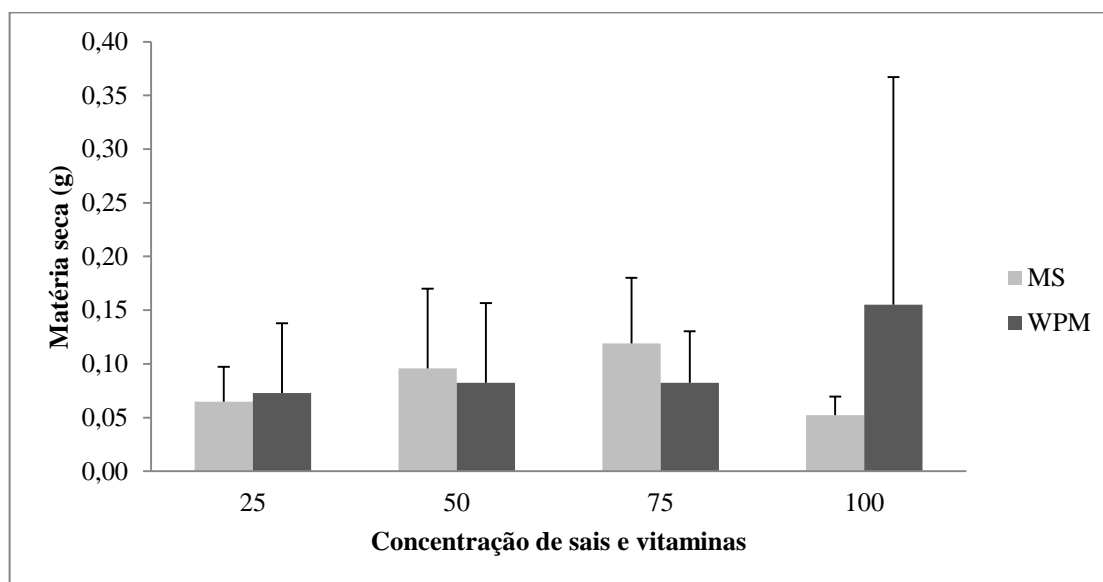
**Figura 6:** Médias do número de folhas dos explantes de *E. incanus*, em respostas aos meios MS e WPM em diferentes concentrações ao longo do tempo.



**Figura 7:** Número de folhas por explantes de *E. incanus*, em respostas a diferentes tipos de meio de cultura e concentrações.

O peso de matéria seca dos explantes aos 75 dias, nos tratamentos do meio WPM mostrou tendência crescente com o aumento da concentração, ocorrendo estabilidade nas

concentrações 50 e 75%, e atingindo o maior peso de matéria seca dos explantes na concentração de 100% de sais e vitaminas. Já para os tratamentos do meio MS, com o aumento da concentração de sais e vitaminas ocorreu acréscimo no peso de matéria seca até a concentração de 75%, a partir de então houve decréscimo (Figura 8).



**Figura 8:** Matéria seca dos explantes de *E. incanus*, em respostas aos meios MS e WPM em diferentes concentrações, aos 75 dias.

Os explantes germinados não apresentaram hiperidricidade durante os 75 dias de avaliação, indicando que as condições de cultivo *in vitro* na fase da germinação e crescimento inicial foram adequadas para a espécie.

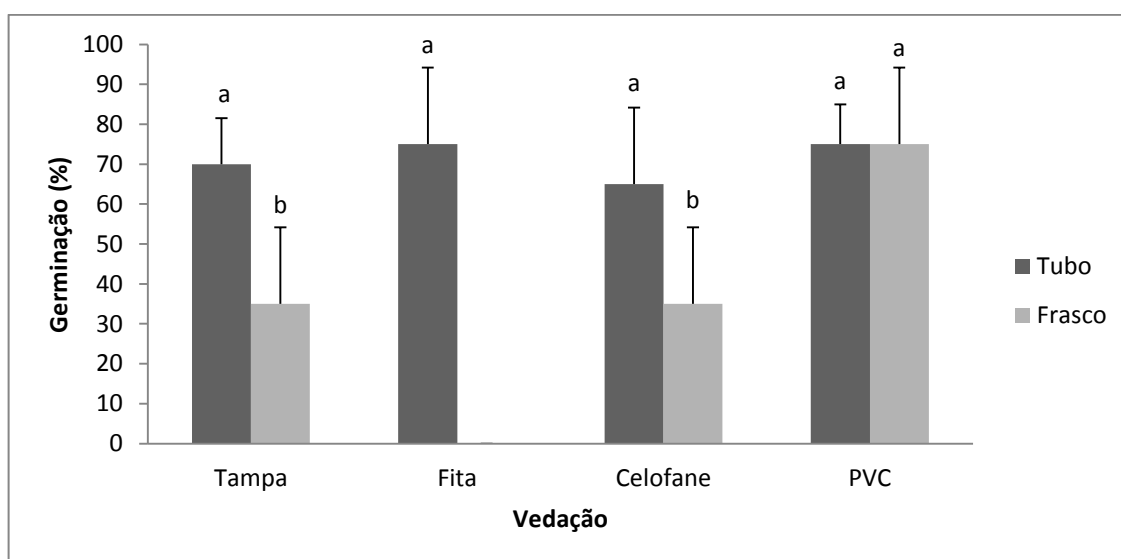
### 3.2. Experimento 2: Influência do tipo de recipiente e vedação na germinação de *E. incanus*

Para o percentual de germinação em diferentes recipientes e vedações, de acordo com a análise de variância, houve diferença significativa entre os tratamentos aos 35 dias (Tabela 3). Os tratamentos frasco+PVC, tubo+fita e tubo+PVC promoveram o maior percentual de germinação, sendo igual a 75%. A germinação no tratamento tubo+tampa foi igual a 70% enquanto que no tratamento tubo+celofane foi de 65%. Já os tratamentos frasco+tampa e frasco+celofane promoveram um percentual de germinação igual a 35% (Figura 9). No tratamento frasco+fita houve intensa evaporação do meio de cultura, ocasionando a morte das plântulas germinadas antes de completar os 35 dias de avaliação. Assim, as Figuras e Tabelas apresentadas não incluem o tratamento, sendo este considerado inadequado para o cultivo *in vitro* de *E. incanus* (Figura 10).

**Tabela 3:** Resultados da análise de variância para o percentual de germinação de *E. incanus* em função de diferentes tipos de recipiente e vedações, aos 35 dias.

Fontes de Variação	GL	QM
Tratamento	6	1357,1*
Resíduo	21	295,2
CV (%)		37,52

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de variação; \* Diferença expressiva a 5% de significância.

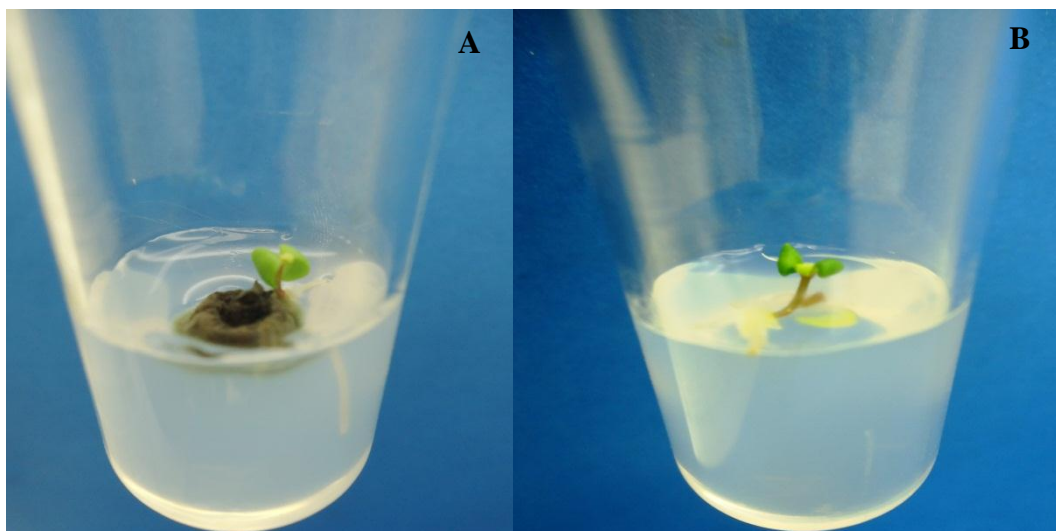


**Figura 9:** Percentual de germinação de *E. incanus* em respostas a diferentes tratamentos de recipientes e vedações, aos 35 dias. Tratamentos apresentando a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o Teste de Tukey, a 5% de significância.



**Figura 10:** Evaporação do meio de cultura no tratamento frasco+fita.

Para a contaminação (Figura 11), de acordo com a análise de variância ocorreu diferença significativa aos 35 dias (Tabela 4). Os tratamentos tubo+tampa e tubo+fita foram os que apresentaram menor percentual de contaminação (10%), sendo estatisticamente superiores aos tratamentos frasco+celofane (55%) e frasco+tampa (60%) (Tabela 5).



**Figura 11:** Explantes de *E. incanus* com presença de estruturas fúngicas (A) e exsudação bacteriana (B).

**Tabela 4:** Resultado da análise de variância para contaminação dos explantes de *E. incanus* em função de diferentes tipos de recipientes e vedações

Fontes de Variação	GL	QM
Tratamento	6	1633,33*
Resíduo	21	352,38
CV (%)		84,13

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de variação; \* Diferença expressiva a 5% de significância.

**Tabela 5:** Percentual médio de contaminação dos explantes de *E. incanus* em função de diferentes tipos de recipientes e vedações

Tratamento	Contaminação (%)
Tubo+fita	10a
Tubo+tampa	10a
Tubo+PVC	20ab
Frasco+PVC	25ab
Tubo+celofane	30ab
Frasco+celofane	55b
Frasco+tampa	60b

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância.

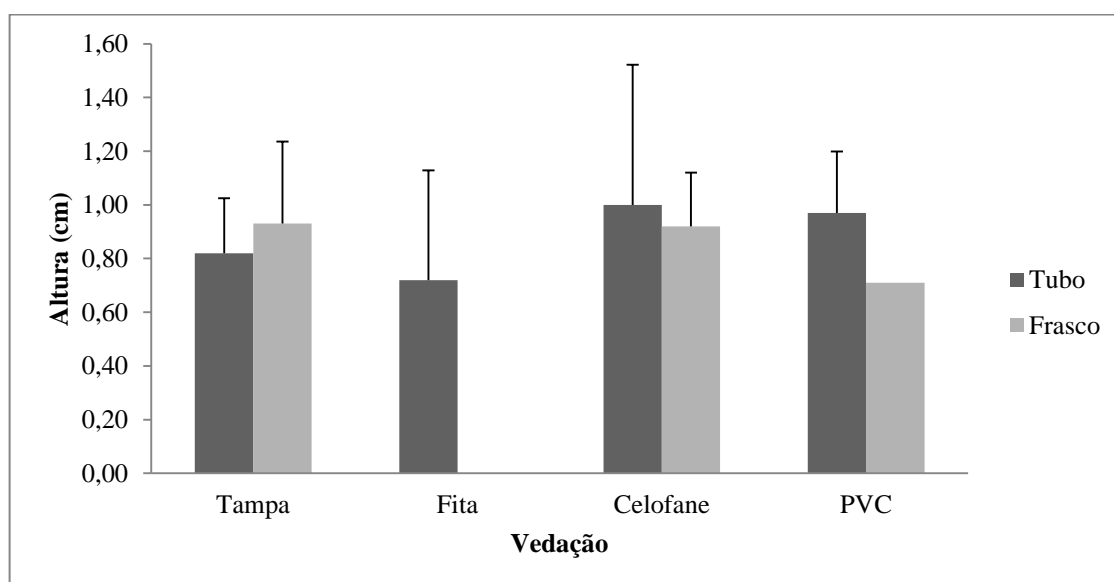
De acordo com o resultado da análise de variância, verificou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos para a altura, número de folhas e peso de matéria

seca, aos 35 dias (Tabela 6). O tratamento tubo+celofane proporcionou maior altura média (1,00 cm), seguido por tubo+PVC, em que a altura dos explantes foi de 0,97cm. A altura média no tratamento frasco+tampa foi igual a 0,93 cm e em frasco+celofane 0,92 cm. Já tubo+tampa proporcionou altura média igual a 0,82 cm, enquanto tubo+fita 0,72 e frasco+PVC 0,71 cm (Figura 12).

**Tabela 6:** Resultados da análise de variância para altura, número de folhas e matéria seca dos explantes de *E. incanus* em função de diferentes tipos de recipientes e vedações

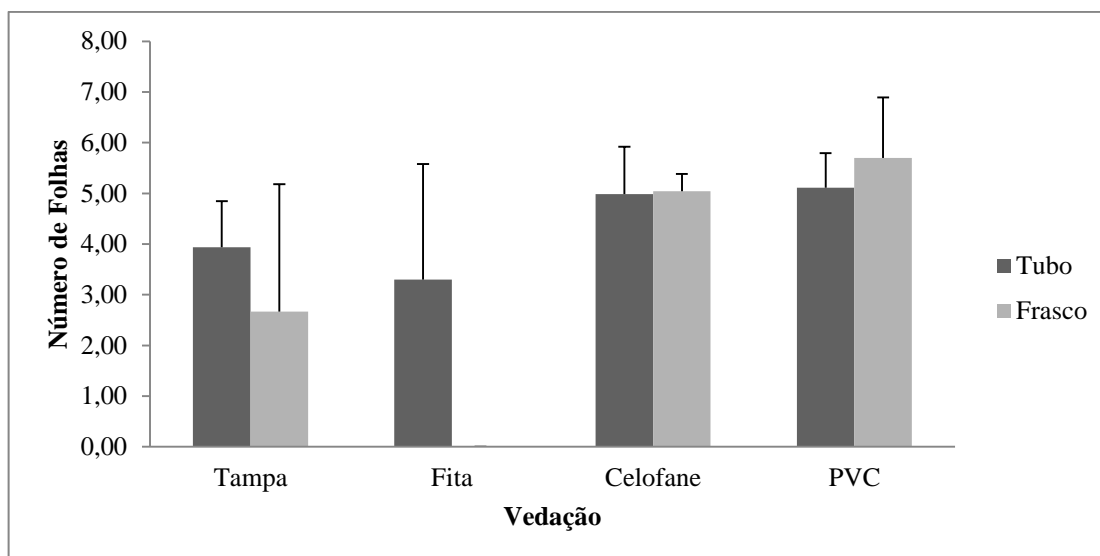
Fontes de Variação	GL	QM		
		Altura	Número de Folhas	Matéria seca <sup>(1)</sup>
Tratamento	6	0,06766 <sup>ns</sup>	4,4070 <sup>ns</sup>	0,3520 <sup>ns</sup>
Resíduo	21	0,10490	1,9671	0,1380
CV (%)		37,2	35,7	20,53

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de variação; <sup>ns</sup> Diferença não expressiva a 5% de significância; <sup>(1)</sup> Valores transformados para logaritmo na base 10 por não apresentar normalidade de resíduos pelo teste Lilliefors e homogeneidade de variâncias pelo teste de Cochran a 5% de significância.



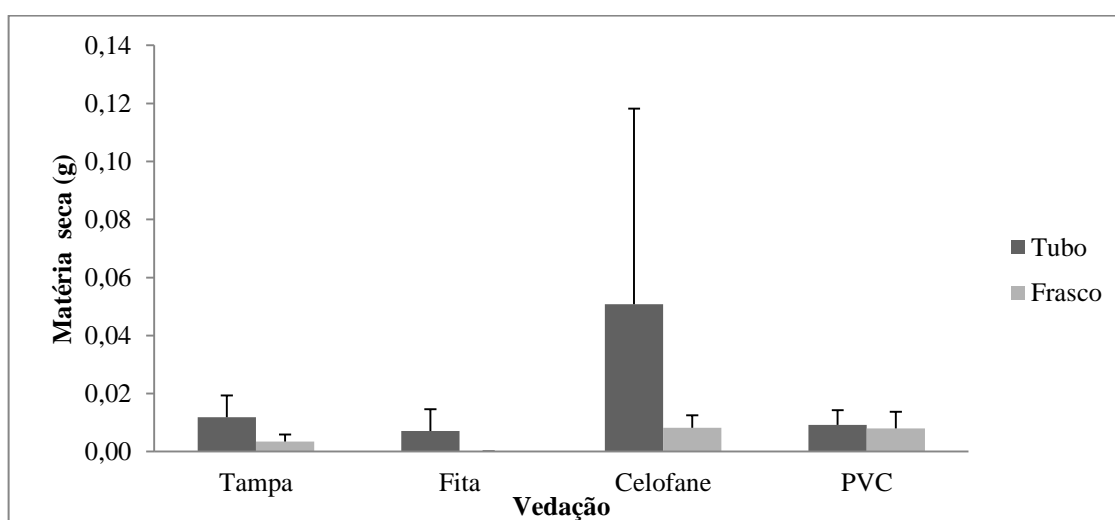
**Figura 12:** Altura média dos explantes de *E. incanus*, em respostas a diferentes tratamentos de recipientes e vedações, aos 35 dias.

O número médio de folhas foi maior nas combinações frasco+PVC e tubo+PVC, respectivamente 5,70 e 5,11. O tratamento frasco+celofane proporcionou média de número de folhas igual a 5,04 e tubo+celofane alcançou 4,99. O tratamento tubo+tampa apresentou número médio de folhas de 3,94, enquanto a média da combinação tubo+fita foi 3,30 e o tratamento frasco+tampa foi o que obteve menor média, 2,67 (Figura 13).



**Figura 13:** Número médio de folhas de *E. incanus*, em respostas a diferentes tipos de recipientes e vedações, aos 35 dias.

A combinação tubo+celofane foi o tratamento em se que obteve maior peso de matéria seca (0,0508 g), seguido por tubo+tampa 0,0118 g. Tubo+PVC apresentou matéria seca igual a 0,0092, enquanto frasco+celofane obteve 0,0082 g e frasco+PVC 0,0080 g. A combinação tubo+fita apresentou matéria seca igual a 0,0071 g, enquanto frasco+tampa foi em que se encontrou o menor peso de matéria seca, 0,0034 g (Figura 14).



**Figura 14:** Matéria seca de explantes de *E. incanus*, em respostas a diferentes tipos de recipientes e vedações, aos 35 dias.

A melhor combinação de recipiente e vedação variou para cada uma das características avaliadas, porém, as quatro combinações que de maneira geral se destacaram foram: tubo+PVC, tubo+tampa, tubo+celofane e frasco+celofane. Não ocorreu hiperidricidade nos explantes durante os 35 dias de avaliação.



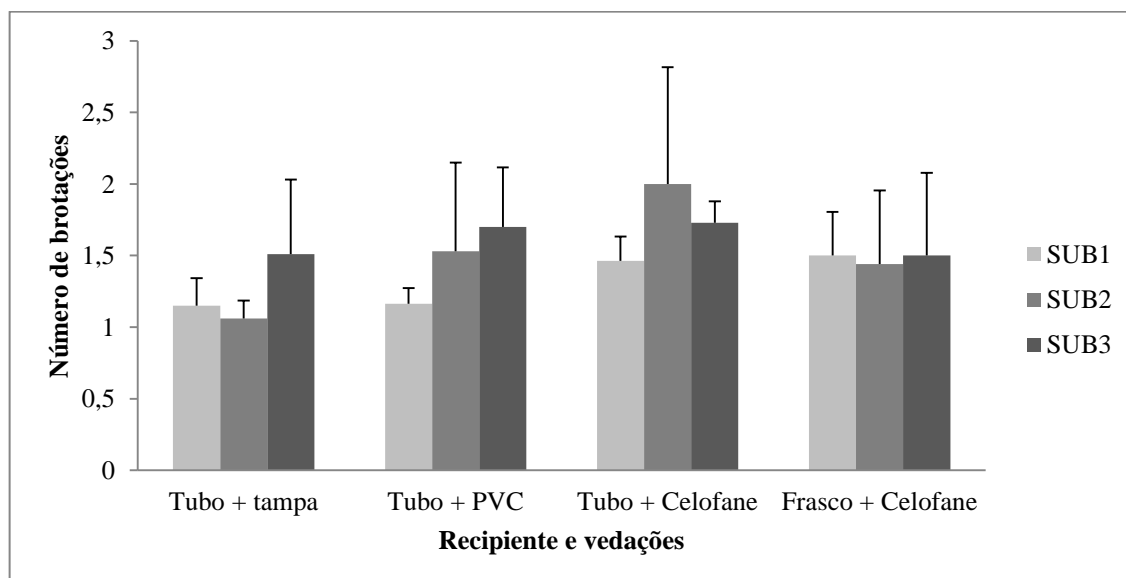
### 3.3. Experimento 3: Efeito de diferentes recipientes e vedações na multiplicação de *E. incanus*

Não houve diferença significativa para o número de brotações para os três subcultivos (Tabela 7). No primeiro subcultivo, a combinação frasco+celofane proporcionou o maior número médio de brotações (1,5). Já no segundo e no terceiro subcultivos o maior número de brotações foi encontrado no tratamento tubo+celofane, respectivamente 2 e 1,73 (Figura 15).

**Tabela 7:** Resultados da análise de variância para o número de brotações dos explantes de *E. incanus* em três subcultivos ( SUB1, SUB2, e SUB3 ), em função de diferentes tipos de recipientes e vedações.

Fontes de Variação	GL	QM		
		SUB1	SUB2	SUB3
Tratamento	3	0,14 <sup>ns</sup>	0,60 <sup>ns</sup>	0,60 <sup>ns</sup>
Resíduos	12	0,05	0,33	0,20
CV (%)		19,91	41,19	25,73

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de variação; <sup>ns</sup> Diferença não expressiva a 5% de significância.



**Figura 15:** Número médio de brotações dos explantes de *E. incanus* em três subcultivos sucessivos (SUB1, SUB2 e SUB3).

Para a avaliação da hiperidricidade (Figura 16), houve diferença significativa entre tipos de recipientes e vedações, no subcultivo 2 (Tabela 8), em que os tratamentos tubo+PVC e tubo+tampa proporcionaram menor hiperidricidade em relação às demais combinações (Tabela 9). No subcultivo 1, a combinação tubo+tampa foi superior aos demais, por apresentar menor ocorrência de hiperidricidade. No subcultivo 3, a combinação

tubo+celofane foi a que apresentou menor hiperidricidade, enquanto para o tratamento tubo+PVC a hiperidricidade foi mais intensa (Figura 17).

**Tabela 8:** Resultados da análise de variância para a hiperidricidade nos explantes de *E. incanus* em três subcultivos ( SUB1, SUB2, e SUB3 ), em função de diferentes tipos de recipientes e vedações

Fontes de Variação	GL	QM		
		SUB1	SUB2	SUB3
Tratamento	3	0,32 <sup>ns</sup>	1,29 <sup>*</sup>	0,78 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	0,04	0,16	0,81
CV(%)		193,10	87,55	80,73

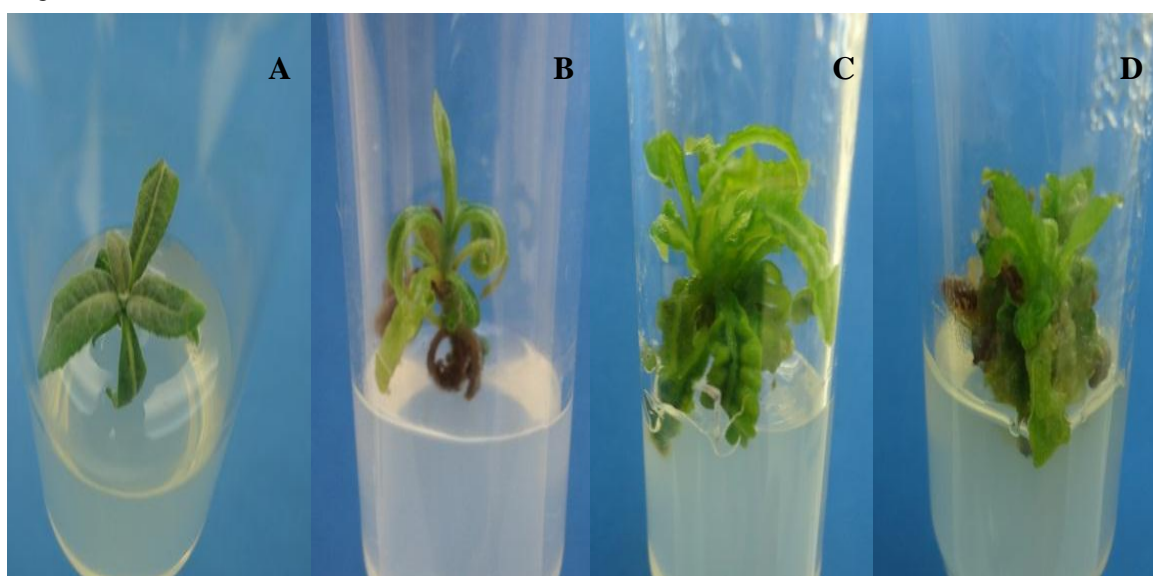
GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de variação; <sup>ns</sup> Diferença não significativa; <sup>\*</sup> Diferença significativa a 5% de significância.

Os altos coeficientes de variação podem ter ocorrido devido a grande variação genética nos explantes, uma vez que, em uma mesma repetição havia diferentes genótipos, que responderam de forma distinta aos tratamentos. Observou-se, que com o aumento dos subcultivos, ocorreu maior hiperidricidade.

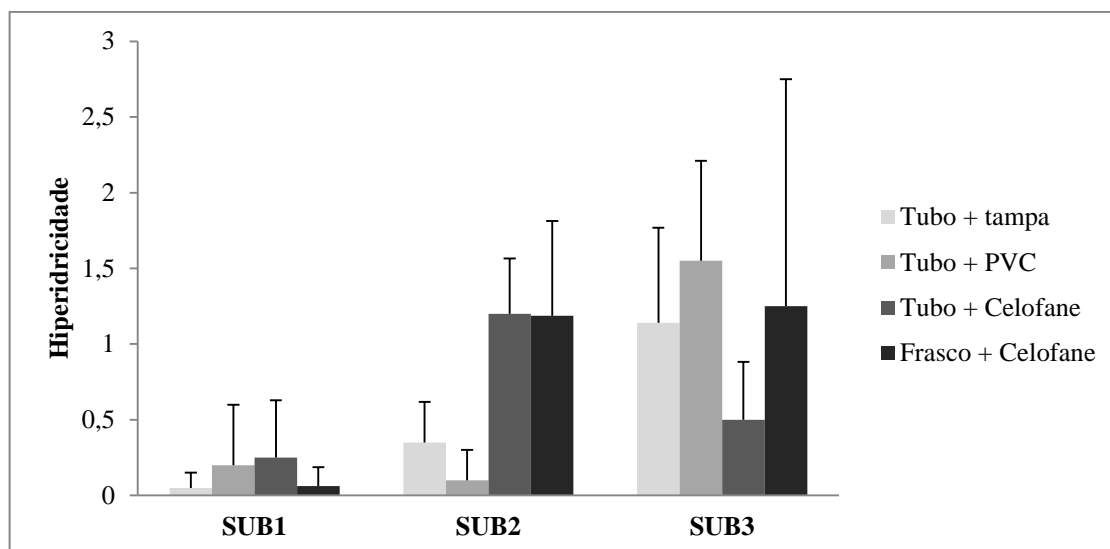
**Tabela 9:** Hiperidricidade em explantes de *E. incanus* em função de diferentes tipos de recipientes e vedações, no subcultivo 2

Tratamento	Hiperidricidade
Tubo + PVC	0,10 a
Tubo + Tampa	0,35 a
Frasco + Celofane	1,19 b
Tubo + Celofane	1,2 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de significância.



**Figura 16:** Classificação da hiperidricidade em explantes de *E. incanus*. A) 0= Inexistente B) 1= Inicial C) 2= Médio D) 3= Avançado.



**Figura 17:** Hiperidricidade em explantes de *E. incanus* em função dos recipientes e vedações, em três subcultivos.

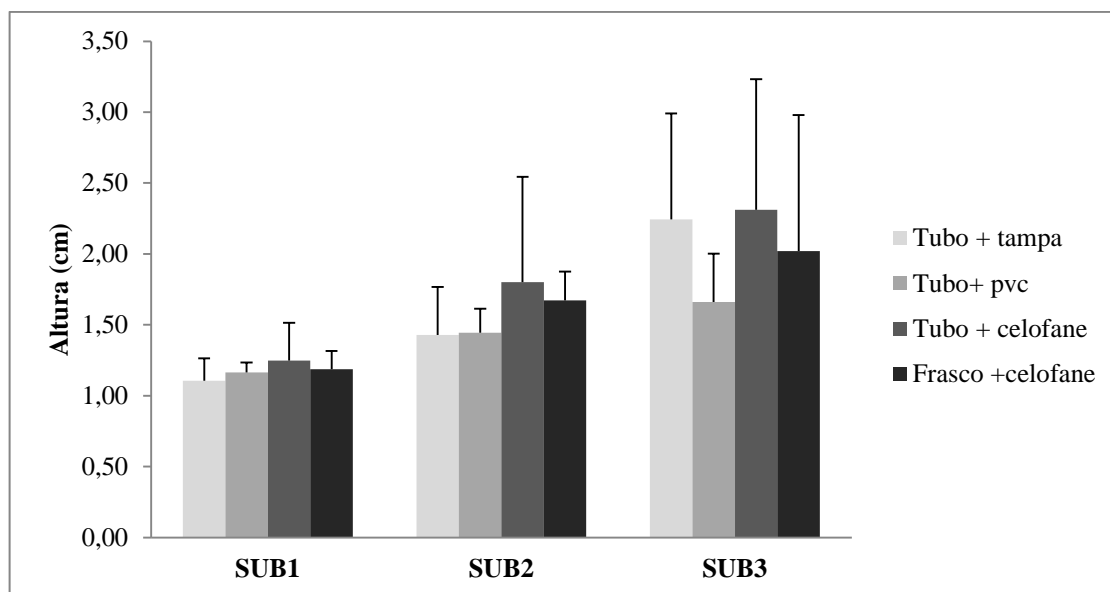
### 3.4. Experimento 4: Efeito de diferentes recipientes e vedações no alongamento de *E. incanus*

Não houve diferença significativa para a altura dos explantes nos três subcultivos (Tabela 10). A combinação tubo+celofane foi a que apresentou as maiores médias, sendo de 1,25; 1,8 e 2,31 cm, na sequência dos três subcultivos (Figura 18). Observou-se, também, que para todos os tratamentos houve aumento das alturas ao longo dos subcultivos.

**Tabela 10:** Resultados da análise de variância para altura dos explantes de *E. incanus* em três subcultivos, em resposta aos diferentes tipos de recipientes e vedações

Fontes de Variação	GL	QM		
		SUB1	SUB2	SUB3
Tratamento	3	0,014 <sup>ns</sup>	0,132 <sup>ns</sup>	0,345 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	0,030	0,184	0,610
CV (%)		13,83	26,26	36,26

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de variação; <sup>ns</sup> Diferença não significativa a 5% de significância; SUB: subcultivo.



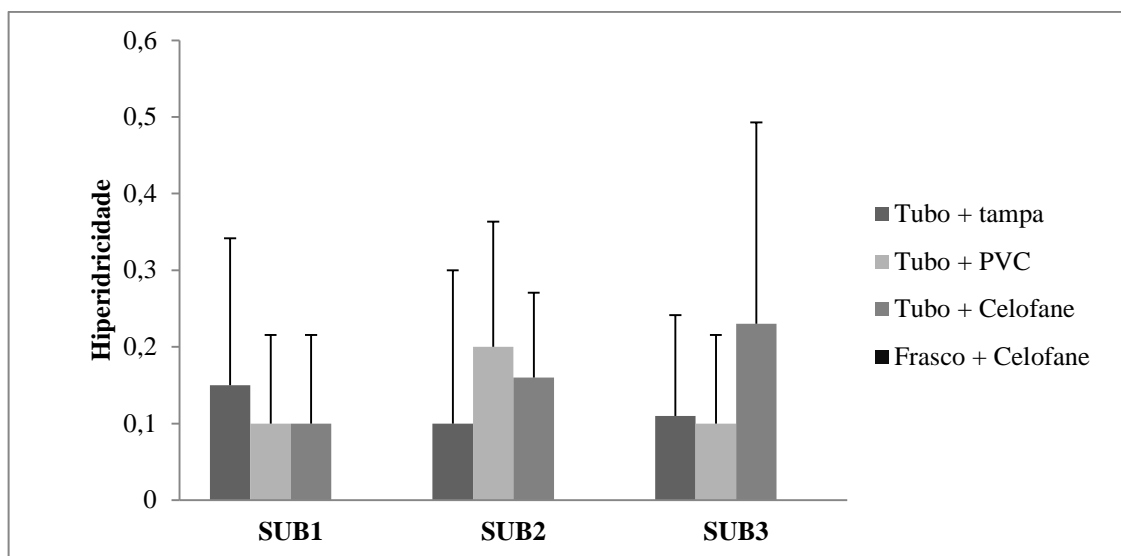
**Figura 18:** Altura dos explantes de *E. incanus*, em três subcultivos em resposta a diferentes tipos de recipientes e vedações.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a hiperidricidade nos explantes (Tabela 11). Nos três subcultivos, para a combinação frasco+celofane, não ocorreu hiperidricidade. Em nenhum dos três subcultivos os explantes apresentaram hiperidricidade em nível avançado (Figura 19).

**Tabela 11:** Resultados da análise de variância para a hiperidricidade em explantes de *E. incanus* em três subcultivos, em resposta a diferentes tipos de recipientes e vedações

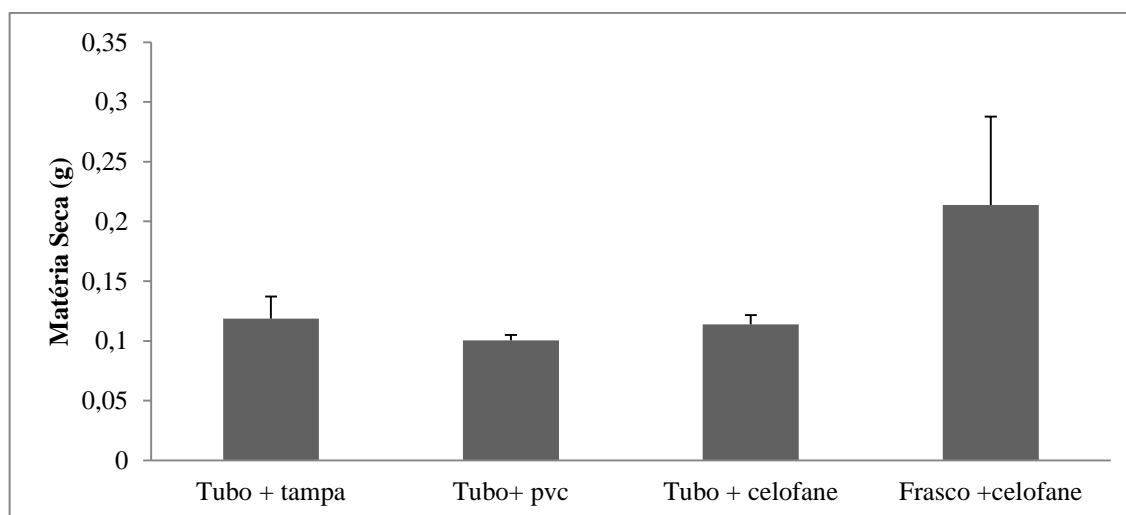
Fontes de Variação	GL	QM		
		SUB1	SUB2	SUB3
Tratamento	3	0,016 <sup>ns</sup>	0,031 <sup>ns</sup>	0,034 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	0,016	0,020	0,025
CV(%)		143,81	128,01	149,51

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de variação; <sup>ns</sup> Diferença não expressiva a 5% de significância.



**Figura 19:** Hiperidricidade em explantes de *E. incanus* em três subcultivos, em resposta a diferentes tipos de recipientes e vedações.

Para o peso de matéria seca, não se realizou a análise de variância, uma vez que mesmo fazendo transformação dos dados para logaritmo na base 10 não houve normalidade de resíduos pelo teste Lilliefors e homogeneidade de variâncias pelo teste de Cochran a 5% de significância. A combinação frasco+celofane apresentou maior peso de matéria seca (Figura 20).



**Figura 20:** Peso de matéria seca de *E. incanus* em respostas aos tipos de recipientes e vedações, na fase de alongamento de explantes.

Durante o período de observação e avaliação, verificou-se enraizamento de alguns explantes. Na combinação tubo+tampa houve o enraizamento de quatro explantes durante os três subcultivos. Na combinação tubo+PVC e frasco+celofane houve o enraizamento de um explante e na combinação tubo+celofane quatro explantes enraizaram (Figura 21).



**Figura 21:** Explantes enraizados durante o alongamento, em resposta a diferentes tipos de recipientes e vedações.

### 3.5. Experimento 5: Efeito das citocininas Benzilaminopurina e Thidiazuron na multiplicação de *E. incanus*

Houve diferença significativa entre os tratamentos para o número de brotações, no subcultivo 1, para os fatores Citocinina e Concentração, de forma isolada (Tabela 12). O maior número de brotações foi alcançado com a citocinina BAP, e dentre as concentrações,  $0,75 \text{ mg L}^{-1}$  mostrou-se superior às demais (Tabela 13 e Figura 22). Apesar de não ocorrer diferença significativa no subcultivo 2, o tratamento BAP na concentração  $0,75 \text{ mg L}^{-1}$  apresentou maior número de brotações (Figura 23). Houve diminuição no número de brotações do subcultivo 1 para o subcultivo 2, em todos os tratamentos.

**Tabela 12:** Resultados da análise de variância para o número de brotações em explantes de *E. incanus* em dois subcultivos em resposta a diferentes tipos de citocininas e concentrações

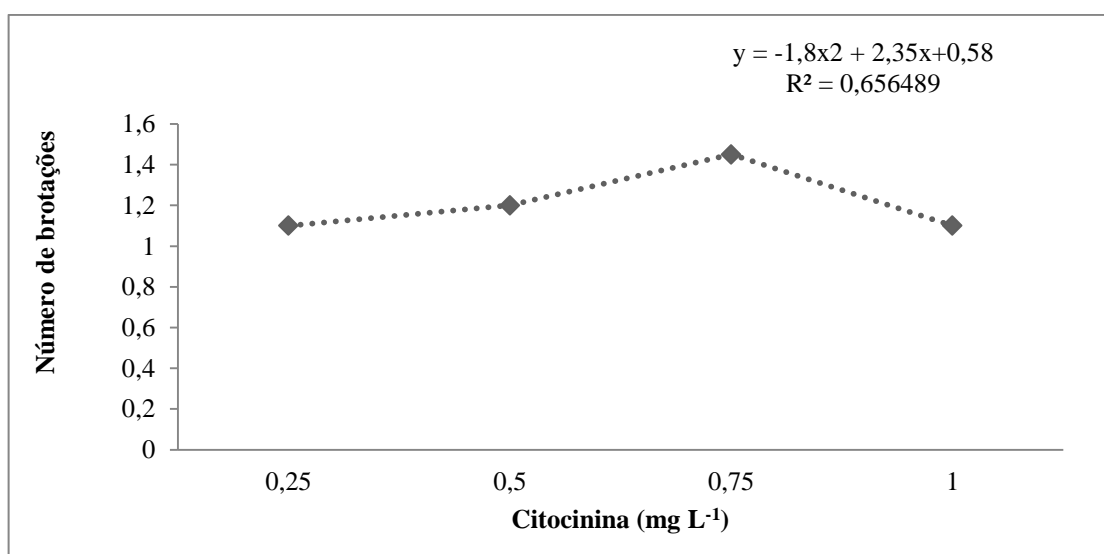
Fontes de Variação	GL	QM	
		SUB1	SUB2
Citocinina	1	0,32 <sup>*</sup>	0,08 <sup>ns</sup>
Concentração	3	0,22 <sup>*</sup>	0,02 <sup>ns</sup>
Citocinina*Concentração	3	0,04 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	0,03	0,02
CV(%)		20	15,55

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de variação; <sup>ns</sup> Diferença não significativa; \* Diferença expressiva a 5% de significância; SUB: subcultivo.

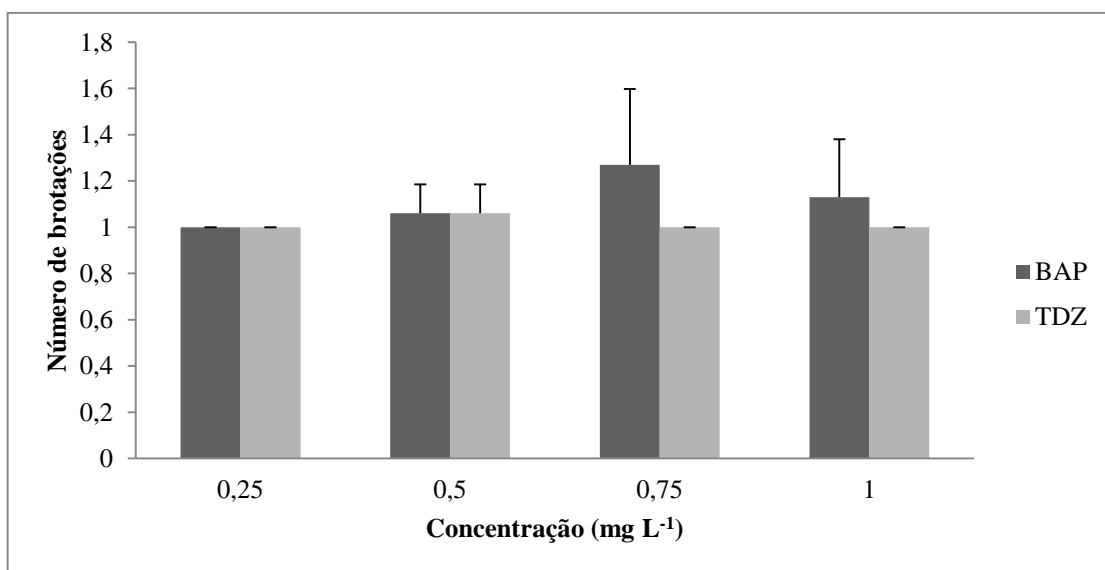
**Tabela 13:** Número de brotações por explantes de *E. incanus*, em função de diferentes citocininas, no subcultivo 1

Citocinina	Número de brotação
BAP	1,31 <sup>a</sup>
TDZ	1,11 <sup>b</sup>

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância.



**Figura 22:** Número de brotações por explantes de *E. incanus*, em resposta a diferentes concentrações de citocininas, no SUB1.



**Figura 23:** Número de brotações em explantes de *E. incanus*, em resposta a diferentes tipos de citocininas e concentração no SUB2.

Para a hiperidricidade, ocorreu diferença significativa para o fator citocinina nos dois subcultivos (Tabela 14), sendo que o BAP apresentou plantas com menor nível de hiperidricidade (Tabela 15). No subcultivo 1, o tratamento BAP 1 mostrou-se superior aos demais por apresentar plantas com menor nível de hiperidricidade e o tratamento TDZ 0,75 foi o que apresentou maior hiperidricidade. Já no SUB2 o tratamento BAP 0,5 apresentou explantes com menor hiperidricidade (Figura 24).

**Tabela 14:** Resultados da análise de variância para hiperidricidade em explantes de *E. incanus* em dois subcultivos em resposta a diferentes tipos de citocininas e concentrações

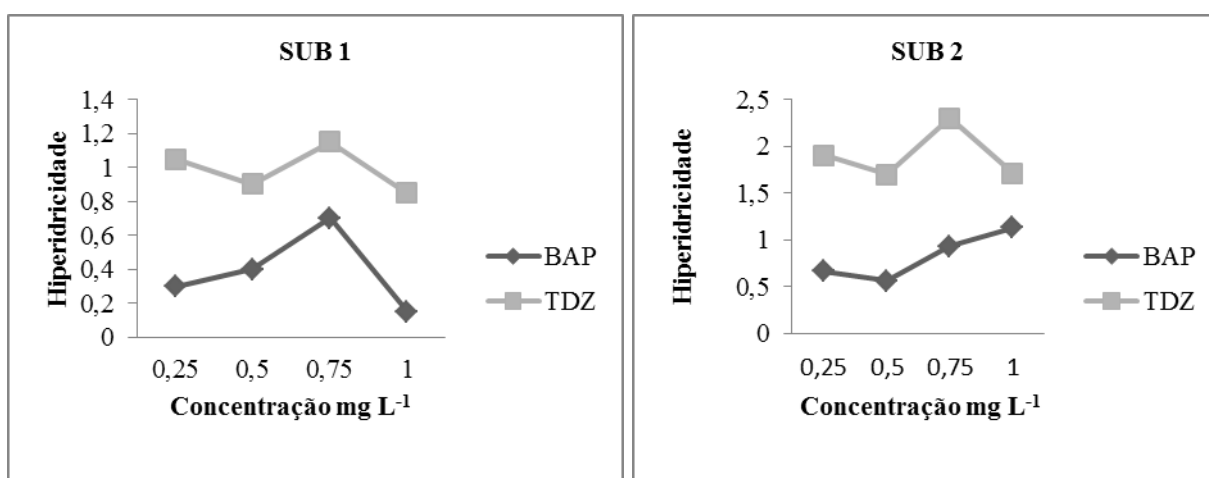
Fontes de Variação	GL	QM	
		SUB1	SUB2
Citocinina	1	2,88*	9,37*
Concentração	3	0,25 <sup>ns</sup>	0,34 <sup>ns</sup>
Citocinina*Concentração	3	0,04 <sup>ns</sup>	0,24 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	0,29	0,44
CV(%)		85,20	61

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de variação; \* Diferença expressiva a 5% de significância.

**Tabela 15:** Hiperidricidade em explantes de *E. incanus*, em resposta a diferentes tipos de citocininas, em dois subcultivos (SUB1 e SUB2)

Citocinina	Hiperidricidade	
	SUB1	SUB2
BAP	0,39a	0,82a
TDZ	0,99b	1,90b

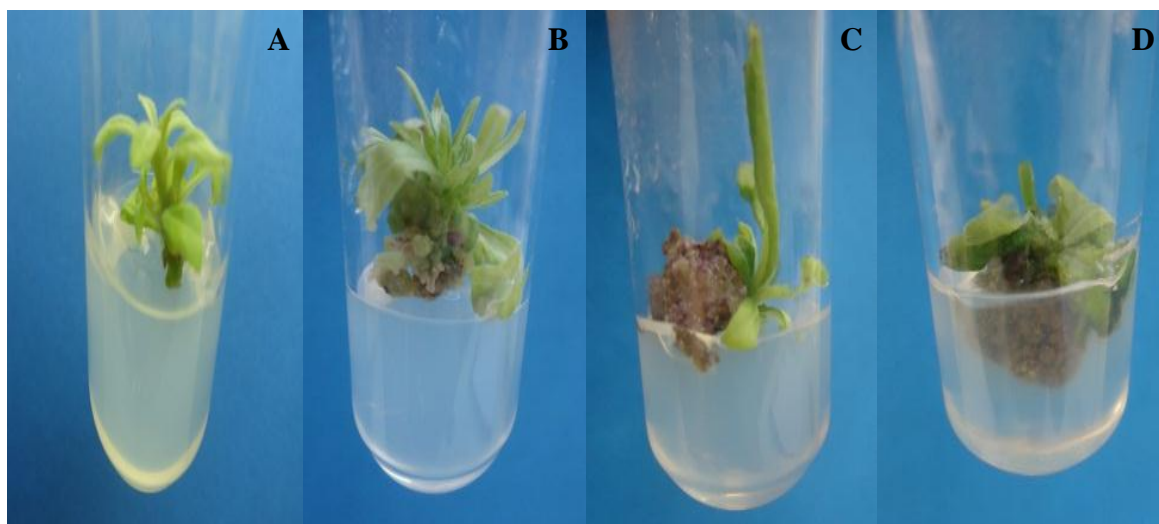
Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste F a 5% de significância.



**Figura 24:** Hiperidricidade em explantes de *E. incanus* em resposta a diferentes tipos de citocininas e concentração, em dois subcultivos sucessivos.



Para calosidade (Figura 25), houve diferença significativa para o fator citocinina, de acordo com a análise de variância (Tabela 16), sendo o BAP superior ao TDZ, por apresentar menor nível de calosidade. O tratamento TDZ 0,5 foi o que apresentou maior calosidade, e o tratamento BAP 0,25 apresentou menor nível de calosidade (Figura 26).

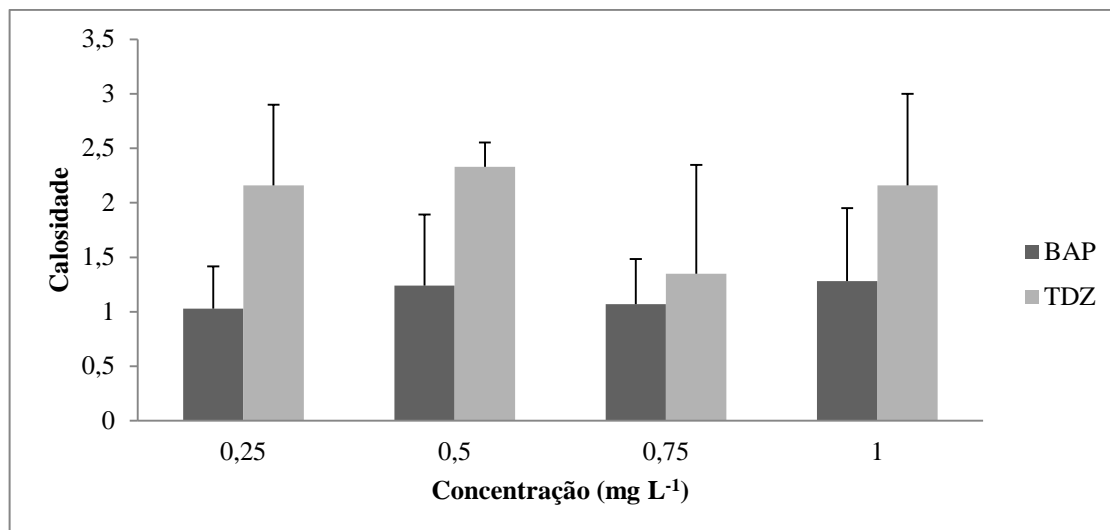


**Figura 25:** Classificação de calosidade em explantes de *E. incanus*. A) 0= Inexistente B) 1= Baixa C) 2= Média D) 3= Alta.

**Tabela 16:** Resultados da análise de variância para calosidade em explantes de *E. incanus* no segundo subcultivo, em resposta a diferentes tipos de citocininas e concentrações

Fontes de Variação	GL	QM
Citocinina	1	5,75*
Concentração	3	0,53 <sup>ns</sup>
Citocinina*Concentração	3	0,31 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	0,44
CV(%)		49,34

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de variação; <sup>ns</sup> Diferença não significativa; \* Diferença expressiva a 5% de significância.



**Figura 26:** Nível de calosidade em explantes de *E. incanus*, em resposta a diferentes tipos de citocininas e concentração.

#### 4. DISCUSSÃO

Para a germinação de *E. incanus*, o meio WPM proporcionou o maior percentual de sementes germinadas. Enquanto que para as características de altura e número de folhas se destacou o meio MS. O meio WPM pode ter se destacado, alcançando maior percentual de germinação, por apresentar menor concentração de sais, não afetando assim o balanço osmótico, e possibilitando maior disponibilidade de água para a fase de embebição. Já para as outras características avaliadas, altura, número de folhas e brotações o meio MS pode ter se destacado por disponibilizar maior concentração de íons nitrato e amônia para os explantes.

Os meios de cultura consistem de uma mistura balanceada de macro e micronutrientes, carboidratos, fontes orgânicas de nitrogênio, vitaminas e reguladores de crescimento (QUISEN; ANGELO, 2008). O meio MS com 100% de sais e vitaminas não tem se mostrado satisfatório para algumas espécies lenhosas, de forma que composições mais diluídas, como as do meio WPM, podem apresentar melhores resultados (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990). A composição do meio de cultura pode variar de acordo com as necessidades nutricionais de cada espécie (DUTRA et al., 2009).

Em *Hancornia speciosa*, quando se utilizou os meios de cultura WPM, WPM2x, WPM/2, MS e MS/2, os meios WPM e MS/2 promoveram 100% de germinação (SOARES et al, 2009). Já em *Eremanthus erythropappus*, os meios de cultura mais eficientes para a germinação foram WPM/4 e WPM, enquanto o meio MS/2 promoveu a menor porcentagem de germinação (ROSAL, 2004).

Miranda (2015), testando os meios MS 50%, MS 100%, WPM 50% e WPM 100% (com adição de  $0,6 \text{ mg L}^{-1}$  BAP e  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA), verificou que o meio MS 100% promoveu o maior número de brotações em explantes de *E. incanus*. No estabelecimento *in vitro* de embriões em *Tabebuia serratifolia* os meios de cultura MS e WPM ambos proporcionaram resultados semelhantes (NERY et al., 2008). Para a micropropagação de *Lavandula angustifolia*, quando testados os meios MS, MS/2, LS e WPM, com relação à altura das brotações, o meio de cultura MS proporcionou os melhores resultados. Para o número de folhas por brotações e o número de brotações os meios MS/2 e WPM foram responsáveis pela redução quando comparado aos meios de cultura MS e LS (MACHADO, 2011).

Os recipientes para o cultivo *in vitro* são destinados a proporcionar um ambiente estéril para o estabelecimento da cultura. Diferentes tipos de frascos têm sido utilizados. Alguns desses frascos possuem tampas herméticas, ou outras que deixam pequena abertura, ou são dotadas de material poroso para permitir trocas gasosas entre o interior e o exterior do frasco (GRATTAPAGLIA; MACHADO 1998). Ribeiro et. al (2007), testando tipos de vedações (frascos vedados com papel alumínio, algodão e filme de polivinilcloreto) em *Melissa officinalis*, com a vedação de papel alumínio encontraram a maior média de altura e número de brotos em explantes, já o efeito da vedação filme de polivinilcloreto proporcionou um acréscimo na média para a variável número médio de entrenós.

Hawerorth et. al (2010), em cultura de pereira (*Pyrus* spp.), concluíram que o comprimento médio das brotações e a massa fresca total não diferiram entre os tipos de vedação empregados (algodão, alumínio e PVC). Em *Hancornia speciosa* foram avaliadas as vedações com tampa de plástico, filme de PVC, Para-film® e papel alumínio. Para a fase de estabelecimento, as vedações PVC e Para-filme® apresentaram os melhores resultados, já para o primeiro subcultivo o Para-filme® foi superior e no segundo subcultivo o PVC e Para-filme® promoveram os melhores resultados (SÁ et.al, 2012).

Miranda (2015), testando tampas de *Kimble* em polietileno, plástico filme e fita microporosa em três subcultivos de *Eremanthus incanus*, avaliando diversas variáveis, constatou que mesmo promovendo rebaixamento do meio de cultura, o uso de fita microporosa para vedação dos tubos de ensaio foi o mais indicado dentro das condições testadas.

No experimento 2, o uso de duas camadas de fita microporosa também ocasionou rebaixamento do meio de cultura, principalmente com o uso do frasco como recipiente,

mostrando que determinados tipos de vedações e recipientes podem permitir maior ou menor troca gasosa com o meio externo, interferindo no desenvolvimento do explante. De maneira geral, dentro das condições de condução dos experimentos e dos parâmetros avaliados, a combinação do recipiente tubo de ensaio com vedação papel celofane mostrou-se superior às demais nos experimentos de germinação, de multiplicação e de alongamento de *E. incanus*. Esse resultado indica que a combinação tubo mais celofane permite trocas gasosas de maneira adequada entre o ambiente em que a espécie está sendo cultivada e o meio externo, não permitindo excessivo acúmulo de gases prejudiciais ao desenvolvimento do cultivo dos explantes *in vitro*.

Conforme Grattapaglia; Machado (1998), o tipo de frasco e a quantidade de meio utilizado afetam diretamente a área superficial da interface meio-atmosfera. O volume de ar sobre o meio e a profundidade do meio, também afetam a composição da fase gasosa do frasco, e consequentemente o desenvolvimento e crescimento da cultura. As combinações testadas nos explantes de *E. incanus*, quando se utilizou frasco como recipiente, com exceção da combinação frasco e celofane, mostrou-se menos eficiente do que com o uso de tubo de ensaio.

Para o nível de hiperidricidade ocorreu variação em relação à combinação do tipo de recipiente e vedação utilizadas. No experimento 3, a combinação tubo e tampa apresentou-se superior às demais, enquanto que no experimento 4, a combinação frasco e celofane foi melhor. Houve também aumento no nível de hiperidricidade em decorrência do aumento dos subcultivos.

O excesso de vapor de água na atmosfera do frasco é também um dos principais responsáveis pela hiperidricidade. A diminuição da umidade relativa é obtida com a mudança para um tipo de tampa que permita melhor trocas gasosas (GRATTAPAGLIA; MACHADO 1998). Batista (2012) avaliando três tipos de vedações em frascos: tampas de polipropileno rígido sem membrana, com uma e com duas membranas em *Capsicum annuum*, verificou que a umidade relativa, no interior dos frascos sem membrana, possivelmente foi mais alta do que naqueles com membranas.

Ivanova; Staden (2010) estudaram a ventilação para reduzir hiperidricidade em culturas de tecidos de *Aloe polyphylla* e verificaram que a troca gasosa entre a atmosfera *in vitro* e o ambiente externo é um pré-requisito essencial para controlar a hiperidricidade, e que no cultivo com ventilação promovida por modificação nas vedações dos recipientes, a

hiperidricidade foi completamente eliminada. No presente trabalho constatou que o tipo de vedação do recipiente influencia as trocas gasosas, o que pode favorecer ou não a presença de hiperidricidade nos explantes de *E. incanus*.

No experimento 5, quando se utilizou o TDZ nas mesmas concentrações que o BAP, nos dois subcultivos, os explantes apresentaram menor números de brotações, indicando que o TDZ ao invés de estimular pode ter inibido a produção de brotações. A diminuição no número de brotações do primeiro subcultivo para o segundo pode estar relacionada ao fato das citocininas possuírem grande efeito residual, assim como, a grande produção de calos principalmente para o TDZ pode indicar toxidez.

O BAP corresponde à citocinina mais utilizada nos trabalhos de micropropagação de espécies florestais (OLIVEIRA et. al, 2013). Já o TDZ atua de forma mais ativa na multiplicação, podendo se tornar um inibidor de crescimento, quando utilizado na mesma concentração de outras citocininas (ALVES et al.,1995). A definição do tipo e da concentração de citocinina para a multiplicação constitui um passo importante. O uso de citocinina estimula maior produção das partes aéreas, porém, o excesso é tóxico. O efeito das citocininas não se restringe a uma subcultura, pois muitas vezes se verifica um efeito residual de uma subcultura para outra (GRATTAPAGLIA; MACHADO 1998).

Em *Cordia trichotoma* o uso de BAP, quando comparado ao TDZ, proporcionou maior número de brotações formadas por explante. Inicialmente, o TDZ proporcionou uma grande proliferação de brotações, mas ao longo da cultura essas brotações se apresentaram malformadas, com caules curtos e retorcidos e folhas atípicas (MANTOVANI et. al, 2001). Em *Pyrus pyrifolia* ('Hosui' e 'Kosui'), verificou-se que a hiperidricidade foi maior quando se utilizou TDZ do que com o uso BAP (KADOTA; NIIMI, 2003). O mesmo foi confirmado pelo presente trabalho, que o uso do TDZ, quando comparado ao BAP, apresentou maior nível de hiperidricidade e ocorrendo também aumento desse nível com o aumento do número de subcultivos. Portanto, constata-se que o tipo e a concentração de citocinina utilizada pode favorecer a ocorrência de hiperidricidade em *E. incanus*.

## 5. CONCLUSÕES

- Para a germinação de sementes de *E. incanus*, o meio WPM com 75% de sais e vitaminas é o mais indicado, enquanto para o estabelecimento da cultura o mais indicado é o meio MS na concentração 75%;
- O tipo de recipiente e vedação influenciam na multiplicação, no alongamento e na ocorrência de hiperidricidade dos explantes da espécie, sendo que a combinação do recipiente tubo de ensaio com a vedação papel celofane transparente proporcionou melhores resultados;
- Quando comparadas as citocininas BAP e TDZ, o BAP mostrou-se superior. Portanto, é indicado para a multiplicação de *E. incanus* a citocinina BAP na concentração de 0,75 mg L<sup>-1</sup>.
- Os resultados apresentados nesse trabalho sugerem que mais estudos envolvendo a propagação in vitro de *E. incanus* sejam realizados, principalmente relacionados às etapas de enraizamento e aclimação, de forma a consolidar uma metodologia para a espécie.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA C. S.; SILVA A. V. C.; ARAÚJO A. G.; LÉDO A. S. Respostas morfogênicas de jenipapeiro em diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, n.1, p. 58 - 64, 2015.

ALVES, R. M. M.; LEMOS, G. B.; COSTA, M. P. *et al.* Efeitos do thidiazuron na atividade da fosfatase ácida durante a micropropagação da arnica (*Solidago microglosa*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. **Anais ...** Lavras, 1995. p. 196.

BATISTA, D. S. **Influência de trocas gasosas, do etileno e de poliaminas na morfogênese *in vitro* de pimenteira ornamental (*Capsicum annuum* L.)**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de plantas**. **Brasília**: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPV, 1998. p. 87-132.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão 2006, p.28 (Embrapa Algodão. Documentos, 148).

CRÈVECOEUR M.; KEVERS C.; GREPPIN H.; GASPAR Th. A comparative biochemical and cytological characterization of normal and habituated sugarbeet calli. **Biologia Plantarum**, v.29, n.1, p.1-6, 1987.

DEBERGH P; AITKEN-CHRISTIE J; COHEN D; GROUT B; VON ARNOLD; ZIMMERMAN R; ZIV M. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.30, n. 2, p. 135-140, 1992.

DEBERGH, P.; HARBAOUI, Y.; LEMEUR, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. **Physiologia Plantarum**, Lund, n.53, p. 181-187, 1981.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 49-59, 2009.

FEITOSA, S. DOS S.; DAVIDE, A. C.; TONETTI, O. A. O.; FABRICANTE J. R., JOSÉ LUI, J. J. Estudos de viabilidade de sementes de candeia *Eremanthus erythropappus* (dc.)

Macleish por meio de testes de germinação e raios x . **Floresta**, Curitiba, PR, v. 39, n. 2, p. 393-399, abr./jun. 2009.

FRÁGUAS, C.B.DORNELLES C. M. V.; LIMA G. P. P. Benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na indução e multiplicação *in vitro* de gemas de abacaxizeiro da cultivar 'IAC Gomo-de-mel'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.994-1000, 2009.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**, part 1 – the technology. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GEORGE E F. **Plant Propagation by Tissue Culture**, Part 2. In: Practice. Exegetics Ltd, Edington, 1996.

GOLLE D. P; REINIGER L. R. S.; MUNIZ M. F. B.; HANAUER J.; FLÔRES A. V.; LEÓN E. A.B. Seleção de lotes de sementes de *Pinus taeda* l. para a cultura de tecidos. **Cerne**, Lavras, v. 20, n. 2, p. 259-266, 2014

GUTIÉRREZ I. E. M.; NEPOMUCENO C. F; SILVA T. S., FONSECA P. T, CAMPOS V. C. A, ALVIM B. F. M, CARNEIRO F. S., ALBUQUERQUE M. M. S., SANTANA J. R. F. Multiplicação *in vitro* de *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n.2, p. 143-151, 2013.

HASSANNEJAD S.; BERNARD F.; MIRZAJANI F.; GHOLAMI M. SA improvement of hyperhydricity reversion in *Thymus daenensis* shoots culture may be associated with polyamines changes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.51, p.40-46, 2012.

HAWERROTH, F. J. SOUZA, A. L. K. AFFONSO, L. B.; NASCIMENTO, D. C.; SCHUCH, M. W. Multiplicação fotoautotrófica *in vitro* de pereiras 'Abate Fetel'. **Ciência Rural**, v.40, n.6, jun, 2010.

IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schonland ex Pillans. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 60, p. 143–15, 2010.



IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Nitrogen source, concentration, and  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, p. 167–174, 2009.

KADOTA, M.; NIIMI, Y. Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 72, p. 261–265, 2003.

KEVERS C.; FRANCK T; STRASSER R. J.; DOMMES J.; GASPAR T, Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state, **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht v.77; p. 181e191, 2004.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Seattle, v.30, p.421- 427, 1980.

LUCENA L. R. F. **Desenvolvimento *in vitro* e imunolocalização de 5-metilcitosina em raízes tuberizadas e não-tuberizadas de *Viguiera arenaria* Baker (Asteraceae).** 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

MACHADO M. P. **Micropropagação e composição química do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* Miller.** ). Dissertação (Programa de Pós- Graduação Produção Vegetal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; VESTENA, S. REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE LOURO-PARDO (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.

MIRANDA, N. A. **Micropropagação de candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less).** Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Ciência Florestal), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n. 3, p.473-497, 1962.

NAVROSKI M. C.; REINIGER L. R.S; PEREIRA M. O. Alongamento *in vitro* de rebentos de *Eucalyptus dunnii* em função de diferentes genótipos e concentrações de ácido 1-naftil-acético (ANA). **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, vol.38, p.79-86, 2015.

NERY, M. C.; CARVALHO, M. L. M.; OLIVEIRA, L. M.; NERY, F. C.; SILVA, D. G. Germinação in vitro e ex vitro de Embriões e sementes *Tabebuia serratifolia* (VAHL) NICH. **Cerne**, Lavras, v. 14, n. 1, p. 1-8, jan./mar. 2008.

OLIVEIRA, J. E. Z.; AMARAL C. L. F.; CASALI V. W. D. Caracterização isozimática e atividade de peroxidase em folhas de plantas hiperídrica, intermediária e normal de *Bidens pilosa* L. mantidas *in vitro*. **Ciências Agrotécologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 32-36, 2008.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, out./dez. 2013.

PÁDUA J. A. R. **Genética da paisagem: áreas prioritárias para manejo e conservação de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish no Estado de Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) Lavras, 2011.

PALMA D.; SCHUELTER, A. R.; STEFANELLO, S.; FORTE, A. M. T. Aspectos morfofisiológicos e controle da hiperhidricidade na cultura de tecidos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.17, n.2-4, p.174-184, 2011.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PERERA P. I. P.; KULARATENE J. D. J. S.; WEERAKOON L K. Effect of Gelling Agent and Selective Sub-culturing on Hyperhydricity in Anther-Derived Coconut Embryos. **International Journal of Research and Development**, v.27, p. 27-37, 2011.

PIQUERAS A.; CORTINA M.; SERNA M.; CASAS J. Polyamines and hyperhydricity in micropropagated carnation plants. **Plant Science**, v.62, p.671- 678, 2002.

QUIALA E. ; JIMÉNEZ-TELLO M. V.; RAÚL BARBÓN R.; MAITÉ CHÁVEZ; FERIA M.; LA O M.; PÉREZ M. Influence of 6-Benzyladenine and gelling agent on the reduction of hyperhydricity in *Tectona grandis* L. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Bogotá, v.16 , p. 129-136, 2014.

QUISEN R. C.; ANGELO P. C. S. **Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônica Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 44p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 61).

RIBEIRO, M. V.; LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. M.; RUBIN, S.; BENITEZ, L. C.; PETERS J. A.; E BRAGA, E. J. B. Concentrações de Sacarose e Tipos de Vedação no Cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 843-845, jul. 2007.

ROSAL, L. F. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish)**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Agronomia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

ROSAL, L. F.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R. M. Micropropagation of the medicinal plant *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish. **HortScience**, Alexandria, v. 42, n. 6, p. 1420- 1424, 2007.

SÁ, A. J.; LÉDO, A. S.; LÉDO, C. A. S.; PASQUAL, M.; SILVA, A. V. C.; JUNIOR, J. F. S. Sealing and explant types on the mangaba micropropagation. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 4, p. 406-414, 2012.

SAHER, S. PIQUERAS A.; HELLIN E.; OLMOS E. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Lund, v.120, p.152-161, 2004.

SARTOR F. R.; ZANOTTI R. F.; PÔSSA K. F.; PILON A. M.; FUKUSHIMA C. H. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do Jacarandá da Bahia. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.

SCHERER, L. M. **Citronela de java (*Cymbopogon winterianus* jowitt): efeito da sazonalidade e de reguladores vegetais sobre a Multiplicação *in vitro* e rendimento do óleo essencial**. 83p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2007.

SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D. de; DAVIDE, A. C. **O manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência florestal em Minas Gerais**. Ed. UFLA, Lavras, 2012, 329p.

SCOLFORO, J. R. S; OLIVEIRA, A. D. de; DAVIDE, A. C.; MELLO, J. M. de; ACERBI JUNIOR, F. W. **Manejo sustentável da candeia *Eremanthus erythropappus* e *Eremanthus incanus***: relatório técnico científico. Lavras: UFLA, 2002. 350 p.

SOARES, F. P.; PAIVA R., STEIN V. C.; NERY, F. C; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA L. M. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA3 e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia Speciosa* GOMES). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1847 -1852, 2009.

STATSOFT, INC. (2010). STATISTICA (DATA ANALYSIS SOFTWARE SYSTEM), VERSION 10. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)

TABART J.; FRANCK T.; KEVERS C.; DOMMES J. Effect of polyamines and polyamine precursors on hyperhydricity in micropropagated apple shoots. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.120, p.11-18, 2015.

TEIXEIRA, M.C.B.; NUNES, Y.R.F.; MAIA, K.M.P.; RIBEIRO, R.N. Influência da luz na germinação de sementes de candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Shuh. Bip.). In: ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICA, 28., 1996, Belo Horizonte. **Anais ...** Belo Horizonte: SBB. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 1996, p. 35-41.

TONETTI, O.A.; DAVIDE, A.C.; DA SILVA, E.A.A. Qualidade física e fisiológica de sementes de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac. Leish). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, n.1, p.114-121,2006.

TORRES, A.C.; BARBOSA, N. V. R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A.V. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas: formulações de meios para a cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2001 20p (Circular Técnica, 24).

TSAY H-S.; CHEN-YU LEE C-Y; AGRAWAL D. C.; BASKER S. Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* – a medicinal plant. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Gaithersburg v.42, p. 445–449, 2006.

VELTEN, S. B.; GARCIA, Q. S. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Eremanthus* (Asteraceae), ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 753-761, 2005.

VICENTE, M. A. A; ALMEIDA, W. A. B.; CARVALHO, Z. S. Multiplicação in vitro e aclimação de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, p.176-183, 2009.

YU Y., ZHAO Y-Q.; ZHAO B.; REN S.; GUO Y-D. Influencing factors and structural characterization of hyperhydricity of in vitro regeneration in *Brassica oleracea* var. *italica*. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 91, p.159-165, 2011.

ZIV, M. *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: Withers, L. A.; Alderson, P. G., eds. **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterworths; p. 187, 1986.